

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

097446543

PCT/JP98/02765

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

22.06.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1997年 6月23日

REC'D 07 AUG 1998

WIPO

PCT

出願番号  
Application Number:

平成 9年特許願第165437号

出願人  
Applicant(s):

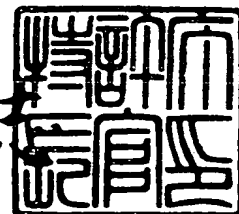
武田薬品工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 7月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

山佐 建



出証番号 出証特平10-3060151

【書類名】 特許願

【整理番号】 A97140

【提出日】 平成 9年 6月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N-15/12

【発明の名称】 ペプチドの用途

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1丁目7番地9 武田春日ハイツ 1  
402号

【氏名】 日沼 州司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代 4丁目22番地 松代4丁目団地 2  
-203号

【氏名】 川俣 裕二

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000052

【包括委任状番号】 9000053

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】ペプチドの用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤。

【請求項2】 G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩が、配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤。

【請求項3】 配列番号：73で表されるアミノ酸配列が、配列番号：5、8、47、50、61または64である請求項2記載のプロラクチン分泌調節剤。

【請求項4】 プロラクチン分泌促進剤である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤。

【請求項5】 プロラクチン分泌抑制剤である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤。

【請求項6】 卵巣機能低下症、精嚢発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などの予防または治療薬である請求項1記載のプロラクチン分泌促進剤。

【請求項7】 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、乳癌などの予防または治療薬である請求項1記載のプロラクチン分泌抑制剤。

【請求項8】 畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤。

【請求項9】 プロラクチン分泌機能の検査薬である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、生理活性ペプチドの用途に関する。さらに詳しくは、本発明は、G蛋白質共役型レセプター（受容体と呼ぶこともある）蛋白質に対するリガンド・ポリペプチドを含有するプロラクチン分泌調節剤に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているグアニンヌクレオチド結合性蛋白質（guanine nucleotide-binding protein、以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行う。また、これらのレセプターは、7個の細胞膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプター（7TMR）と総称される。

このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターによる生体の機能を調節する経路の一つとして視床下部一下垂体系がある。これは、視床下部ホルモン（向下垂体性ホルモン）によって下垂体からの下垂体ホルモンの分泌が調節され、血中に放出された下垂体ホルモンを介して標的細胞・器官の機能調節が行われるものである。この経路によって、ホメオスタシスの維持や生殖系、個体の発達、代謝、成長の調節などの生体にとって重要な機能調節が行われている。下垂体ホルモンは視床下部ホルモンと標的内分泌腺より分泌される末梢ホルモンによるポジティブフィードバック機構またはネガティブフィードバック機構によって分泌調節されている。下垂体に存在する各種のレセプター蛋白質は、視床下部一下垂体系を調節する上で中心的な役割を担っている。

【0003】

また、これらのホルモン、因子およびそのレセプターは、視床下部一下垂体系だけに限局して存在するのではなく、一般に脳内に広く分布することが知られている。このことから、視床下部ホルモンと呼ばれている物質が、中枢神経系にお

いては神経伝達物質あるいは神経調節物質として機能していると考えられている。また、末梢組織においても同様に分布し、それぞれ重要な機能を担っていると考えられている。

従来、上記G蛋白質共役型レセプター蛋白質のうち、それに対するリガンドが未知であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する手段としては、リガンドが公知であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質との一次構造上の類似性を頼りに、推定する方法しかなかった。

最近、リガンドが不明な、いわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一種であるLC132あるいはORL-1をコードするcDNAをCHO細胞に導入し、該レセプター細胞内情報伝達系を構築し、該レセプター蛋白質に対するアゴニストと同様の細胞内情報伝達シグナルを検出することにより、該レセプター蛋白質に対する新規オピオイド・ペプチド・リガンドを探索した例が報告されている(Reinsheid, R. K. et al., Science, 270巻、792-794頁、1995年; Menular, J.-C., et al., Nature 377巻、532-535頁、1995年)。しかし、これらの場合、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との類似性やそのレセプター蛋白質の組織分布から、それに対するリガンドはオピオイドペプチドのファミリーに属するペプチドリガンドであることが予測されていた。即ち、オピオイドレセプターを介して生体に作用する物質についての研究・開発の歴史は長く、種々のアンタゴニストおよびアゴニストが既に開発されていた。そこで、人為的に合成した化合物群の中からこのLC132またはORL-1に対するアゴニストをスクリーニングし、これをプローブとしてそのアゴニストと同様な細胞内情報伝達系の活性化物質を探索し、これを精製し、リガンドとしての構造を決定している。

#### 【0004】

しかし、この例のようにオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質のうち、それに対するリガンドがおおよそでも推定されるものはほとんどないのが現状である。特に、公知のレセプター蛋白質ファミリーと類似性が低い、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の場合には、それに対するリガンドに関する情報がほとんどないために、そのリガンドを特定することは勿論のこと、推定するこ



とすら困難であった。

そのようなリガンドが未知の、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一つとして、p h G R 3（または G P R 1 0と呼ばれることもある）遺伝子によってコードされるヒト型レセプター蛋白質〔ゲノミックス (Genomics), 第29巻, 第335頁 (1995年)〕、およびそれに対応するラット型レセプター蛋白質U H R - 1〔バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 第209巻, 第606頁 (1995年)〕が知られている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

下垂体、中枢神経系および膵臓β細胞等で発現しているオーファンG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドは、医薬として有用であると考えられるが、その構造および機能については明らかにされていない。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一つである、p h G R 3をコードするcDNAを発現させた細胞を用い、特異的な細胞刺激（シグナル伝達）活性の測定等を指標に、該レセプター蛋白質がリガンドとして認識するウシ由来のポリペプチドをスクリーニングし、そのアミノ酸配列およびDNA配列を決定した。ウシ由来の該ポリペプチドをコードするDNAをプライマーとして用い、PCR (polymerase chain reaction) 法により該ポリペプチドをコードするウシ、ヒトおよびラット由来のcDNAを単離し、そのラット由来のcDNA配列を基にプライマーを作成し、PCR法により、マウス由来の該ポリペプチドをコードするcDNAおよびゲノムDNA配列を単離することに成功した。

さらに、本発明者らは、これらのcDNA配列を基にp h G R 3およびU H R - 1に対するリガンドとして機能する生理活性ペプチドを同定することに成功した。また、同定した該生理活性ペプチドを合成し、その生理作用の解析を進めた結果、該生理活性ペプチドが、下垂体に対しプロラクチンの放出を調節する作用

を有することを見いだした。

【0007】

すなわち、本発明は、

(1) G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩を含有するプロラクチン分泌調節剤、

(2) G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩が、配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤、

(3) 配列番号：73で表されるアミノ酸配列が、配列番号：5、8、47、50、61または64である請求項2記載のプロラクチン分泌調節剤、

(4) プロラクチン分泌促進剤である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤、

(5) プロラクチン分泌抑制剤である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤、

(6) 卵巣機能低下症、精囊発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などの予防または治療薬である請求項1記載のプロラクチン分泌促進剤、

(7) 高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌などの予防または治療薬である請求項1記載のプロラクチン分泌抑制剤、

(8) 畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤、および、

(9) プロラクチン分泌機能の検査薬である請求項1記載のプロラクチン分泌調節剤に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、I

UPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体が存在する場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ

【0009】

GlyまたはG	: グリシン
AlaまたはA	: アラニン
ValまたはV	: バリン
LeuまたはL	: ロイシン
IleまたはI	: イソロイシン
SerまたはS	: セリン
ThrまたはT	: スレオニン
CysまたはC	: システイン

Me t またはM	: メチオニン
G l u またはE	: グルタミン酸
A s p またはD	: アスパラギン酸
L y s またはK	: リジン
A r g またはR	: アルギニン
H i s またはH	: ヒスチジン
P h e またはF	: フェニルアラニン
T y r またはY	: チロシン
T r p またはW	: トリプトファン
P r o またはP	: プロリン
A s n またはN	: アスパラギン
G l n またはQ	: グルタミン
p G l u	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

【0010】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

BHA : ベンズヒドリルアミン

pMBHA : p-メチルベンズヒドリルアミン

Tos : p-トルエンスルフォニル

CHO : ホルミル

HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

OCHEX : シクロヘキシルエステル

Bzl : ベンジル

Cl<sub>2</sub>-Bzl : ジクロロベンジル

B o m : ベンジルオキシメチル  
 Z : ベンジルオキシカルボニル  
 B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

---

B o c : t-ブチルオキシカルボニル  
 D C M : ジクロロメタン  
 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
 D C C : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド  
 T F A : トリフルオロ酢酸  
 D I E A : ジイソプロピルエチルアミン  
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 D N P : ジニトロフェニル  
 B u m : ターシャリープトキシメチル  
 T r t : トリチル

【0011】

本明細書において、「実質的に同一」とは、蛋白質の活性、例えば、リガンドと受容体の結合活性や生理的な特性などが、実質的に同じであることを意味する。従って、「実質的に同一」のアミノ酸配列とは、蛋白質の活性、例えば、リガンドと受容体の結合活性や生理的な特性などが、実質的に同じである（著しい変化を生じていない）状態が保たれる範囲の変異を有していてもよいアミノ酸配列を意味する。

一般に、ポリペプチド配列中におけるアミノ酸の置換、欠失あるいは挿入（付加）などの変異は、そのポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな（著しい）変化をもたらさないことがしばしばあることは、よく知られた事実である。該置換の例としては、あるアミノ酸が性質（特性）の似ている他のアミノ酸で置換されたものが挙げられ、一般的には、特性の類似性が強いアミノ酸相互間で置換が行われる場合ほど、その置換が置換前の元のポリペプチドにおよぼす特性の変化は小さいと考えられている。

アミノ酸は、その特性の類似性を一つの基準にして例えば次のようなクラスに分類される。（i）非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、

イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。(ii) 極性(中性)アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。(iii) 陽電荷をもつ(塩基性)アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。(iv) 負電荷をもつ(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。本明細書中で対象とするアミノ酸配列中のアミノ酸の「実質的に同一」な置換物としては、例えばそのアミノ酸が属するクラスのうち特性の似ている他のアミノ酸類から選ばれることが多い。

本発明においては、元の(無変異の)ポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に重大な(著しい)変化をもたらさないような置換、欠失あるいは挿入等のアミノ酸配列における変異の結果得られるポリペプチド(変異型ポリペプチド)は、そのような変異を有していない元の(無変異の)ポリペプチドと実質的に同一であると見なされ、またその変異型ポリペプチドのアミノ酸配列は、元の(無変異の)ポリペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であると見なされる。

なお、本発明におけるポリペプチド中の構成アミノ酸は、D体またはL体のいずれであってもよいが、特にことわらない限り通常はL体が好ましい。

#### 【0012】

本発明におけるポリペプチドは、G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩、即ちG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドポリペプチドまたはその塩であり、具体的には例えば、配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩(以下、単にリガンドポリペプチドまたはポリペプチドと略称する場合がある)が挙げられる。配列番号：73で表される該アミノ酸配列として好ましくは、配列番号：5、8、47、50、61または64で表されるアミノ酸配列が挙げられ、とりわけ、配列番号：61または64で表されるアミノ酸配列、さらに好ましくは、配列番号：64で表されるアミノ酸配列が挙げられる。

本発明における該ポリペプチドとしては、ヒトや温血動物(例えば、モルモッ

ト、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる組織（例えば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するポリペプチドであって、具体的には例えば、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：5、8、47、50、61または64で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであればよい。例えば、本発明における該リガンドポリペプチドとしては、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：5、8、47、50、61または64で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：5、8、47、50、61または64で表されるアミノ酸配列と約50～99.9%（好ましくは70～99.9%、より好ましくは80～99.9%、さらに好ましくは90～99.9%）の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：5、8、47、50、61または64で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが挙げられる。該活性としては、例えばレセプター結合活性、シグナル伝達活性など、該リガンドポリペプチドが有する活性が挙げられる。活性が「実質的に同質」とは、該レセプター結合活性などの特性が同質であることを示す。従って、該レセプター結合活性には著しくない程度の強弱が認められてもよく、また、該リガンドポリペプチドの分子量における相違は問題ではない。ヒトや温血動物の同じ属由来の実質的に同一のペプチドが、由来する種の違い（例えば、人種間の違い等）によりそのペプチドの本質的でないアミノ酸配列上の差異が認められることがあるが、本発明における該ポリペプチドとしては、本質的でないアミノ酸配列上の差異によるこれらのペプチドも包含する。

#### 【0013】

本発明のリガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩（以下、単にリガンドポリペプチドまたはポリペプチドと略称する場合がある）、その製造法および用途を以下にさらに詳細に説明する。

本発明のリガンドポリペプチドとして、具体的には例えば、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列を含有するラット、ウシ、ヒトまたはマウス由来のポリペプチドなどが挙げられる。（なお、配列番号：73において第10番目のXaaはAlaまたはThr、第11番目のXaaはGlyまたはSer、第21番目のXaaはH、Gly、またはGlyArgを示す。）

また、本発明の該リガンドポリペプチドには、

(i) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加した（挿入された）アミノ酸配列、さらには、

(iv) 上記(i)、(ii)または(iii)のポリペプチド中の構成アミノ酸（特にその側鎖）に修飾を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチド、またはそのアミド、エステルもしくはその塩も含まれる。

上記(iii)のポリペプチドのうち好ましくは、配列番号：73で表されるアミノ酸を含有するポリペプチドおよび配列番号：73で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドのN末端に、配列番号：74で表されるペプチドがさらに付加したアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどを挙げることができる。

本発明の該リガンドポリペプチドは、そのアミノ酸配列中に上記(i)ないし(iv)の置換、欠失、付加、修飾などを意図的または偶発的に施すことにより、熱やプロテアーゼに対する安定型リガンドポリペプチドや、該リガンドポリペプチドの有する生理活性が高まった高活性型リガンドポリペプチドに変異（変換）させることが可能である。本発明における該リガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、これら変異型リガンドポリペプチドも包含する。



【0014】

本明細書において、ペプチドの標記は、その慣例に従い、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）として記載する。

本発明のポリペプチド中の構成アミノ酸における修飾の例としては、例えば、GlnのN端側が生体内で切断され、該Glnがピログルタミン酸化したものなどが挙げられる。

本発明におけるポリペプチド、例えば配列番号：73で表されるポリペプチドは、C末端アミノ酸残基の $\alpha$ -カルボキシル基が、通常はカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端アミノ酸残基の該カルボキシル基がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。 $-\text{COOR}$ で表される該エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、ベンジル、フェネチルなどのフェニル $\text{C}_{1-2}$ アルキル基、ベンズヒドリルなどのジフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル、もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキルなどの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが挙げられる。

また、本発明におけるポリペプチド、例えば配列番号：73で表されるポリペプチドが、C末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば前述のC末端アミノ酸残基のエステルなどと同様である。

本発明のリガンドポリペプチドとしては特にC末端アミノ酸残基のカルボキシル基がアミドであるペプチドが好ましい。なかでも、配列番号：5、8、47、50、61、64で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのC末端アミノ酸残基のカルボキシル基がアミドであるポリペプチドが好ましい。

本発明のポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例え

ば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0015】

本発明のリガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、(i) ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することができ、また、(ii) 公知のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。さらにまた、(iii) 該ポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養する方法(後述)によって製造することもできる。

(i) 該リガンドポリペプチドを、ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

(ii) 該リガンドポリペプチドは、自体公知のポリペプチドの合成法に従って製造することもできる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。即ち、蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。この場合の公知の縮合方法や保護基の脱離方法としては例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti: ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke: ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他: ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平: 生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

【0016】

上記 (ii) の該リガンドポリペプチドの合成法として具合的には、例えば次の方法などが挙げられる。

該リガンドポリペプチドのアミド体を合成するには、アミド形成に適したペプチド合成用樹脂を用いるとよい。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などが挙げられる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を公知の適当な保護基で保護したアミノ酸を、自体公知の各種縮合方法に従い、目的とするペプチドの配列通りに該樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すとともに各種保護基を除去し、目的のポリペプチドを取得することができる。前述の保護されたアミノ酸を縮合させるには、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化には、ラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用可能な公知の溶媒から適宜選択すればよい。該溶媒としては、例えばN,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセ

トニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが挙げられる。該縮合反応における反応温度は、公知のペプチド結合形成反応に使用可能な温度範囲から適宜選択すればよく、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲が挙げられる。該活性化されたアミノ酸誘導体は、通常1.5～4倍過剰で用いられる。縮合反応の達成度は公知のニンヒドリン反応を用いて確認することができ、その結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化し、後の反応に影響をおよぼさないようにすることもできる。

【0017】

該ペプチド合成の際の原料となるアミノ酸のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、tert-アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、例えば前述の $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、 $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、 $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、tert-ブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、例えばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級( $\text{C}_{1-6}$ )アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、例えばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、tert-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えばBzl、 $\text{Cl}_2\text{-Bzl}$ 、2-ニトロベンジル、Br-Z、tert-ブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

# 【0018】

本発明における該リガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩としては、例えば、上記した配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと同様の作用（下垂体機能調節作用、中枢神経機能調節作用、脾臓機能調節作用、プロラクチン分泌調節作用など、とりわけプロラクチン分泌調節作用）を有している限り、そのアミノ酸配列に変異を有するどのようなペプチドであってもよい。このようなペプチドとしては例えば、配列番号：73で表されるアミノ酸配列を有するペプチドから1ないし15個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。具体的には例えば、①配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第2番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第3番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第4番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、④配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第5番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、⑤配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第6番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、⑥配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第7番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、⑦配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第8番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、⑧配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第9番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、⑨配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第10番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第11番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第12番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第13番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第14

番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第15番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。さらに、配列番号：74で表されるアミノ酸配列を有するペプチドなども好ましい。

配列番号：73で表されるアミノ酸配列としてより好ましい、配列番号：5、8、47、50、61または64についても、配列番号：73で表されるアミノ酸配列について例示したものと同様である。

本発明におけるリガンドポリペプチドは、さらに、他の蛋白質（例、機能または性質がよく知られている公知の蛋白質）との融合蛋白質であってもよい。

#### 【0019】

本発明におけるリガンドポリペプチドをコードするDNAとしては、本発明における配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接RT-PCR（reverse transcription PCR）法によって増幅することもできる。

より具体的には、配列番号：1または配列番号：44のアミノ酸配列を含有するラット全脳あるいはウシ視床下部由来のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。ここで、配列番号：2において第129番目のRはGまたはAを、第179番目および240番目のYはCまたはTを示す。第179番目のYがCのとき、配列番号：1で表されるアミノ酸配列をコードし、第179番目のYがTのとき、配列番号：44で表されるアミノ酸配列をコードする。

#### 【0020】

また、配列番号：3、4、5、6、7、8、9または10で表されるアミノ酸配列を含有するウシ由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：

11、12、13、14、15、16、17または18で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。ここで、配列番号：11、13、14、15の第63番目のRおよび配列番号：12、16、17、18の第29番目のRはGあるいはAを示す。

また、配列番号：45、47、48、49、50、51または52で表されるラット由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：46、53、54、55、56、57または58で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

さらに、配列番号：59、61、62、63、64、65または66で表されるヒト由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：60、67、68、69、70、71または72で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

また、本発明における配列番号：1、配列番号：44で表されるアミノ酸配列を含有するウシ型ポリペプチド、配列番号：45で表されるアミノ酸配列を含有するラット型ポリペプチド、または配列番号：59で表されるアミノ酸配列を含有するヒト型ポリペプチドをコードするDNAの中で例えば6個以上90個以下（好ましくは6個以上60個以下、より好ましくは9個以上30個以下、さらに好ましくは12個以上30個以下）の部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

#### 【0021】

(iii) 本発明におけるポリペプチドをコードするDNAは、以下の遺伝子工学的手法によって製造することもできる。

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニング（クローン化）は、以下の方法に従って行えばよい。即ち、（1）該ポリペプチドの部分塩基配列を有するDNAを合成し、これをプライマーとしてPCR法によって該ポリペプチドを完全にコードするDNAを増幅するか、または、（2）cDNAもしくはゲノムDNA、またはそのDNA断片を適当なベクターに組み込んで得られるDNAライブラリーを、例えば該リガンドポリペプチドの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼ

ーションを行うことにより選別すればよい。該ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) などに記載の方法に従って行えばよい。また、DNAライブラリーとして市販のものを使用する場合は、添付の使用説明書に記載の方法に従って行えばよい。

クローン化された該ポリペプチドをコードするDNAは、そのまま使用しても、または所望により制限酵素で消化した後もしくはリンカーDNAを付加した後に使用してもよい。該DNAは、その5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

#### 【0022】

該ポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) このDNA断片を公知の適当な発現ベクター中のプロモーター配列の下流に連結することにより製造することができる。

該ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。該プロモーターとしては、目的のポリペプチドをコードする遺伝子の発現に用いる宿主において、適切に機能するプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lpp プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターな



どが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどがそれぞれ好ましく挙げられる。なお、目的のポリペプチドをコードする遺伝子を効率よく発現させるためには、エンハンサーを使用することが好ましい。

#### 【0023】

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター $\alpha$ ・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築されたポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

#### 【0024】

形質転換する際の宿主としては、例えば公知のエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが挙げられる。。

該エシェリヒア属菌の具体例としては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 第60巻, 160頁 (1968年)], JM103 [ヌクイレック・アシッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 第9巻, 309頁 (1981年)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 第120巻, 517頁 (1978年)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 第41巻, 459頁 (1969年)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 第39巻, 440頁 (1954年)] などが挙げられる。

該バチルス属菌の具体例としては、例えばバチルス・サチルス (*Bacillus sub*

tilis) M I 1 1 4 [ジーン (gene), 第24巻, 255頁 (1983年)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 第95巻, 87頁 (1984年)] などが挙げられる。

【0025】

該酵母としては、例えばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccaromyces cerevisiae*) A H 2 2, A H 2 2 R<sup>-</sup>, N A 8 7-1 1 A, D K D-5 D, 2 0 B-1 2 などが挙げられる。

該昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが挙げられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 第315巻, 592頁 (1985年)]。

該動物細胞としては、例えばサル細胞 C O S-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 C H O, D H F R 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 C H O (d h f r<sup>-</sup> C H O 細胞), マウス L 細胞, マウスミエローマ細胞, ヒト F L 細胞などが挙げられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー, 第69巻, 2110頁 (1972年) や ジーン, 第17巻, 107頁 (1982年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

バチルス属菌を形質転換するには、例えばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 第168巻, 111頁 (1979年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

酵母を形質転換するには、例えばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー, 第75巻, 1929頁 (1978年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

昆虫細胞を形質転換するには、例えばバイオテクノロジー (Bio/Technology), 第6巻, 47頁 (1988年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

動物細胞を形質転換するには、例えばヴィロロジー (Virology), 第52巻, 456頁 (1973年) に記載の方法に従って行なわれる。

このようにして、ポリペプチドをコードする D N A を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

## 【0026】

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際の培地としては液体培地が好ましく、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他を含有するよう調製される。該炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが、該窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が、該無機物としては、例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、該培地中には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを必要に応じて添加してもよい。該培地のpHは形質転換体が生育するpHであればいずれでもよいが、pHは通常約5～8が好ましい。

## 【0027】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431頁, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972年〕が好ましい。必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に加えて培養してもよい。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 第77巻, 4505頁 (1980年)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 第81巻, 5330頁 (1984年)〕が挙げられ

る。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

【0028】

宿主が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 第195巻, 788頁 (1962頁)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 第122巻, 501頁 (1952年)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 第8巻, 396頁 (1959年)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 第199巻, 519頁 (1967年)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 第73巻, 1頁 (1950年)〕などが挙げられる。。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

【0029】

上記培養物（培養液および培養菌体あるいは培養細胞）からポリペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法に従って行なえばよい。

該ポリペプチドが、培養菌体中あるいは培養細胞中に蓄積される場合は、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁後、公知の超音波処理、リゾチーム処理および／または凍結融解処理などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、公知の遠心分離やろ過などの操作により、目的のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、抽出液として得ることができる。該緩衝液の中には、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100（和光純薬（株）など、登録商標：以下、TMと省略することがある）などの界面活性剤を必要に応じて添加して用いてもよい。

一方、培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養後、まず培養菌体あるいは培養細胞と培養上清とを公知の方法により分離し、培養上清として得ることができる。

得られる培養上清または抽出液中に含まれる、ポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、(1) 塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、(2) 透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、(3) イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、(4) アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、(5) 逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、(6) 等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。。

#### 【0030】

該ポリペプチドが遊離体で得られる場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、該ポリペプチドの精製前または精製後、これに公知の方法に従い適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、該ポリペプチドに任意の修飾を加えたり、該ポリペプチド中の配列を部分的に除去することもできる。該蛋白質修飾酵素としては、例えばトリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが挙げられる。。このようにして得られる変異ポリペプチドの活性は、レセプターとの結合実験や特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ法などにより測定することができる。

#### 【0031】

さらにまた、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌の促進および抑制作用を有する。即ち、本発明におけるリガンドポリペプチドは、後述の実施例から明らかなように、まずプロラクチン分泌の促進作用を有するため、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることが

できる。一方、本発明におけるリガンドポリペプチドは、そのレセプター蛋白質との親和性が強いため、投与量が増えるとプロラクチン分泌に対し脱感作 (desensitization) が起こる結果、プロラクチン分泌を抑制する作用も有する。この場合、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。

従って、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

また、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

本発明におけるリガンドポリペプチドは、とりわけ、高プロラクチン血症、乳汁分泌不全、自己免疫疾患、乳癌の予防および治療薬として有用である。

その他、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、牛、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

#### 【0032】

本発明におけるポリペプチドを前述の医薬または動物薬として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該ポリペプチドまたはその塩

を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

### 【0033】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムの様な結合剤、結晶性セルロースの様な賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などの様な膨化剤、ステアリン酸マグネシウムの様な潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンの様な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーの様な香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂の様な液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水の様なベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの様な天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、ブタ、

ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

【0033】

本発明におけるポリペプチドの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgに対し）においては、一日につき通常約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では成人（体重60kgに対し）においては、一日につき通常約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0034】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、例えば、以下に示す方法によって調製することができる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる組織（例えば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、配列番号：19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはこれらのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。即ち、本発明におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号：19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号：19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列と約90～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。これらの蛋白質が示す活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達などが挙げられる。実質的に同質



とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なっているもよい。

#### 【0035】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質として、さらに具体的には、配列番号：19または（および）配列番号：20で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、配列番号：23で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。そして、配列番号：19および配列番号：20で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、具体的には配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。また、G蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号：19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列中の1以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げられる。

#### 【0036】

ここで、配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質は、ヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を含有するものである。配列番号：19または（および）配列番号：20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質は、該配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質の断片あるいは部分ペプチドである。さらに、配列番号：22または配列番号：23で表されるアミノ酸配

列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質は、マウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるが、配列番号：19または（および）配列番号：20で表されるアミノ酸配列に非常に高い類似性を示す（実施例8、特に〔図13〕）ことから、配列番号：22または23で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質も同様に、配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質の断片あるいは部分ペプチドの中に含まれる。

即ち、上述の配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくは後述する該蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、配列番号：19、20、22または23で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩をも含むものである。

さらに、G蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、GluのN端側が生体内で切断され、該Gluがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

#### 【0037】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、上記したリガンドポリペプチドと同様のものが挙げられる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩または該部分ペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、前述のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養する方法と同じ方法によっても製造することができる。また、前述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。該製造法については、W096/05302の実施例3、4、6および17に詳細に記載されている。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用い

られる。具体的には、〔図3〕、〔図4〕、〔図8〕、〔図11〕または〔図14〕で示される本発明におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、上記したリガンドポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

#### 【0038】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：19、20、21、22または23のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接RT-PCR法によって増幅することもできる。

具体的には、配列番号：19のアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：24で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：20のアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：25で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：21のアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：26で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：22のアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：27で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：23のアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役

型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：28で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

## 【0039】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの方法、用い得るベクター、プロモーター、宿主、形質転換方法、培養方法、分離精製の方法については上記したリガンドポリペプチドの場合と同様である。

例えば、後述する実施例5で得られるプラスミドp hGR3を制限酵素SalIで消化し、hGR3をコードするcDNAの完全長の翻訳枠部分を取り出す。これと同じくSalI消化後に自己閉環を防止するためにBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase)処理を施した動物細胞用発現ベクターpAKK0-111等とライゲーション反応を行う。ライゲーション反応完了後は反応液の一部を用いて大腸菌DH5等を形質転換する。得られた形質転換体のうち、hGR3をコードするcDNAが発現ベクターにあらかじめ組み込んであるSR $\alpha$ などのプロモーターに対して順方向に挿入されているものを制限酵素切断によるマッピングあるいは塩基配列の決定によって選別しそのプラスミドDNAを大量に調製する。作成した発現ベクターのDNAを用い、リン酸カルシウム法あるいはリポソーム法などにもとづく動物細胞への遺伝子導入用のキットを用いてCHO dhfr<sup>-</sup>細胞に導入してG蛋白質共役型レセプター蛋白質(hGR3)高発現CHO細胞株を得る。得られたCHO細胞を核酸不含の選択培地でCO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で1～4日培養することによりG蛋白質共役型レセプター蛋白質(hGR3)を産生させる。該CHO細胞からG蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を担体に架橋させて作製されたアフィニティークラムあるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを担体に架橋させたアフィニティークラムを用いてG蛋白質共役型レセプター蛋白質を分離精製する。このようにして得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性は標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

## 【0040】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法について、以下

にさらに具体的に説明する。

上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または該部分ペプチドもしくはその塩は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探索しまたは決定するための試薬として有用である。即ち、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと、試験化合物とを接触させることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知の他のレセプター蛋白質に対するリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブ インテスティナル アン ド リレイテッド ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -chemokine（IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなど）の他に、例えばヒトや温血動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などをG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

#### 【0041】

具体的には、上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白

質のリン酸化、c-fos 活性化、細胞外 pH の低下などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法を提供する。細胞刺激活性の測定としては上記した中でも特にアラキドン酸遊離を促進する活性または抑制する活性を測定するのが好ましい。

【0042】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する具体的な方法としては、

①標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜面分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定しすることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有す

る形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする方法を挙げることができる。

## 【0043】

該リガンドの決定方法を以下に具体的に説明する。

まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

## 【0044】

したがって、リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質ま

たはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

#### 【0045】

該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の① ~ ③



の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が用いられる。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した上記の試験化合物などが好適である。

#### 【0046】

具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm~50000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0047】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0048】

G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。

リガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45  $\mu m$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの。

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

【0049】

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した

標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

【0050】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

pBOV3に含まれるウシ視床下部由来リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド cDNA の全塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドを精製し、P-3画分のN末端配列分析をした結果得られたアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第23～51番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：4〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドを精製、P-2画分のN末端配列分析をした結果得られたアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第34～52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：5〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第23～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：6〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第23～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：7〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第23～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：8〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第34～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：9〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第34～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：10〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1の第34～55番目のアミノ酸配列に対応している。

【0051】

〔配列番号：11〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：3）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：4）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：5）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：6）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：7）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：8）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：9）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：10）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

【0052】

〔配列番号：21〕

phGR3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAにコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

pG3-2およびpG1-10にそれぞれ含まれるマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列から導きだした塩基配列（配列番号：27）を有するマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

p5S38にコードされるマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

phGR3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

pG3-2およびpG1-10にそれぞれ含まれるマウス膵臓β細胞株MIN

6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列をもとに導き出したマウス脾臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

p5S38に含まれるマウス脾臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：30〕

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔0053〕

〔配列番号：31〕

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：32〕

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：33〕

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：34〕

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：35〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (P5-1)

〔配列番号：36〕

本発明のウシ視床下部由来ポリガンドリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (P3-1)

〔配列番号：37〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (P3-2)

〔配列番号：38〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (PE)

〔配列番号：39〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (PDN)

〔配列番号：40〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (FB)

〔0054〕

〔配列番号：41〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (FC)

〔配列番号：42〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (BOVF)

〔配列番号：43〕

本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードする cDNA のスクリーニングに使用した合成 DNA (BOVR)

〔配列番号：44〕

ウシゲノム由来リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：45〕

pRAV3 に含まれるラット型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。



〔配列番号：46〕

ラット型リガンドポリペプチド cDNA の全塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第2  
2～52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：48〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第2  
2～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：49〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第2  
2～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：50〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第3  
3～52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔0055〕

〔配列番号：51〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第3  
3～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：52〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第3  
3～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：53〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：47）をコードするDNAの塩基  
配列を示す。

〔配列番号：54〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：48）をコードするDNAの塩基  
配列を示す。

〔配列番号：55〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：49）をコードするDNAの塩基

配列を示す。

〔配列番号：56〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：50）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：57〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：51）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：58〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：52）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

pHOB7に含まれるヒト型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：60〕

ヒト型リガンドポリペプチドcDNAの全塩基配列を示す。

【0056】

〔配列番号：61〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第23～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：62〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第23～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：63〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第23～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：64〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第34～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：65〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第34～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：66〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第34～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：67〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：61）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：68〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：62）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：69〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：63）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：70〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：64）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔0057〕

〔配列番号：71〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：65）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：72〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：66）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：73〕

本発明のリガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。ここで、第10番目のXaaはAlaまたはThr、第11番目のXaaはGlyまたはSer、第21番目のXaaはH、Gly、またはGlyArgを示す。

〔配列番号：74〕

本発明のリガンドポリペプチド断片のアミノ酸配列を示す。ここで、第3番目のXaaはAlaまたはThrを示し、第5番目のXaaはGlnまたはArgを示し、第10番目のXaaはIleまたはThrを示す。

〔配列番号：75〕

本発明のラット型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (RA)

〔配列番号：76〕

本発明のラット型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (RC)

〔配列番号：77〕

本発明のラット型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (rF)

〔配列番号：78〕

本発明のラット型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (rR)

〔配列番号：79〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (R1)

〔配列番号：80〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (R3)

【0058】

〔配列番号：81〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (R4)

〔配列番号：82〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (HA)

〔配列番号：83〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニング  
に使用した合成DNA (HB)

〔配列番号：84〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニング  
に使用した合成DNA (HE)

〔配列番号：85〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニング  
に使用した合成DNA (HF)

〔配列番号：86〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニング  
に使用した合成DNA (5H)

〔配列番号：87〕

本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニング  
に使用した合成DNA (3HN)

〔配列番号：88〕

ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (UHR-1) をコードするcDN  
Aのスクリーニングに使用した合成DNA (rRECF)

〔配列番号：89〕

ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (UHR-1) をコードするcDN  
Aのスクリーニングに使用した合成DNA (rRECR)

〔配列番号：90〕

G3PDH, UHR-1, リガンドの増幅に使用した合成DNA (r19F)

【0059】

〔配列番号：91〕

G3PDH, UHR-1, リガンドの増幅に使用した合成DNA (r19R)

〔配列番号：92〕

抗原として使用したリガンドポリペプチドのN末端側ペプチド (ペプチド-I  
)

〔配列番号：93〕

抗原として使用したリガンドポリペプチドのC末端側ペプチド（ペプチド-II）

〔配列番号：94〕

抗原として使用したリガンドポリペプチドの中央部分のペプチド（ペプチド-III）

〔配列番号：95〕

ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質（UHR-1）をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：96〕

ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質（UHR-1）をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

【0060】

後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）INV $\alpha$ F' / p19P2および実施例4で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）INV $\alpha$ F' / pG3-2は、それぞれ平成6年8月9日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）にそれぞれ寄託番号FERM BP-4776およびFERM BP-4775として寄託されており、また平成6年8月22日から財団法人発酵研究所（IFO）にそれぞれIFO 15739およびIFO 15740として寄託されている。

後述の実施例5で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）JM109 / phGR3は、平成6年9月27日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-4807として寄託されており、また平成6年9月22日から財団法人発酵研究所（IFO）にIFO 15748として寄託されている。

後述の実施例8で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）JM109 / p5S38は、平成6年10月27日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-4856として寄託されており、また平成6年10月25日から財団法人発酵研究所（IFO）にIFO 15754として寄託されている。

後述の実施例20で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pBOV3は、平成8年2月13日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5391として寄託されており、また平成8年1月25日から財団法人発酵研究所(IFO)にIFO 15910として寄託されている。

後述の実施例29で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pRAV3は、平成8年9月12日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5665として寄託されており、また平成8年9月3日から財団法人発酵研究所(IFO)にIFO 16012として寄託されている。

後述の実施例32で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pHOV7は、平成8年9月12日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5666として寄託されており、また平成8年9月5日から財団法人発酵研究所(IFO)にIFO 16013として寄託されている。

後述の実施例33で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pmGB3は、平成9年3月5日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-5852として寄託されており、また平成9年2月19日から財団法人発酵研究所(IFO)にIFO 16059として寄託されている。

【0061】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0062】

【参考例1】 G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅させるための合成DNAプライマーの製造

公知のヒト由来TRHレセプター蛋白質(HTRHR)、ヒト由来RANTESレセプター蛋白質(L10918、HUMRANTES)、ヒトバーキットリ

ンパ腫由来リガンド不明レセプター蛋白質 (X68149、HSBLR1A)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター蛋白質 (L14856、HUMSOMAT)、ラット由来 $\mu$ -オピオイドレセプター蛋白質 (U02083、RNU02083)、ラット由来 $\kappa$ -オピオイドレセプター蛋白質 (U00442、U00442)、ヒト由来ニューロメジンBレセプター蛋白質 (M73482、HUMNMBR)、ヒト由来ムスカリン作動性アセチルコリンレセプター蛋白質 (X15266、HSHM4)、ラット由来アドレナリン $\alpha_1$ Bレセプター蛋白質 (L08609、RATAADRE01)、ヒト由来ソマトスタチン3レセプター蛋白質 (M96738、HUMSSTR3X)、ヒト由来 $C_5a$ レセプター蛋白質 (HUMC5AAR)、ヒト由来リガンド不明レセプター蛋白質 (HUMRDC1A)、ヒト由来リガンド不明レセプター蛋白質 (M84605、HUMOPIODRE) およびラット由来アドレナリン $\alpha_2$ B (M91466、RATA2BAR) の第1膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0063】

また、公知のマウス由来リガンド不明レセプター蛋白質 (M80481、MUSGIR)、ヒト由来ボンベジンレセプター蛋白質 (L08893、HUMBOMB3S)、ヒト由来アデノシンA2レセプター蛋白質 (S46950、S46950)、マウス由来リガンド不明レセプター蛋白質 (D21061、MUSGPCR)、マウス由来TRHレセプター蛋白質 (S43387、S43387)、ラット由来ニューロメジンKレセプター蛋白質 (J05189、RATNEURA)、ラット由来アデノシンA1レセプター蛋白質 (M69045、RATA1ARA)、ヒト由来ニューロキニンAレセプター蛋白質 (M57414、HUMNEKAR)、ラット由来アデノシンA3レセプター蛋白質 (M94152、RATADENREC)、ヒト由来ソマトスタチン1レセプター蛋白質 (M81829、HUMSRI1A)、ヒト由来ニューロキニン3レセプター蛋白質 (S86390、S86371S4)、ラット由来リガンド不明レセプター蛋白質 (X61496、RNCGPCR)、ヒト由来ソマトスタチン4レセプター蛋白質 (L07061、HUMSSTR4Z) およびラット由来GnRHレセプター蛋



白質 (M31670、RATGNRHA) の第6膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0064】

上記の ( ) 内の略語は DNASIS Gene/Protein シークエンスデータベース (CD019、日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示される整理番号であり、それぞれ通常 Accession Number および エントリーネームと呼ばれるものである。ただし、HTRHR は特開平 7-304797 号に記載されている配列である。

特に、多くのレセプター蛋白質をコードする cDNA で一致する塩基部分を基準とし、その他の部分においてもなるべく多くのレセプター cDNA と配列の一致性を高めるために混合塩基の導入を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相補的である配列番号：29 または配列番号：30 で表わされる塩基配列を有する合成 DNA 2 本を作成した。

【合成 DNA】

5'-CGTGG (G または C) C (A または C) T (G または C) (G または C) TGGGCAAC (A、G、C または T) (C または T) CCTG-3'

(配列番号：29)

5'-GT (A、G、C または T) G (A または T) (A または G) (A または G) GGCA (A、G、C または T) CCAGCAGA (G または T) GGCAAA-3'

(配列番号：30)

( ) 内は合成時に複数の塩基に混合して合成する。

【0065】

【実施例 1】ヒト下垂体由来 cDNA を用いた PCR 法による受容体 cDNA の増幅

ヒト下垂体由来 cDNA (QuickClone、クロンテック社) を鋳型として用い、参考例 1 で合成した DNA プライマーを用いて PCR 法による増幅を行った。反応液の組成は、合成 DNA プライマー (配列：5' プライマー配列および 3' プライマー配列) 各 1  $\mu$ M、鋳型 cDNA 1 ng、0.25 mM dNTPs、Taq DNA polymerase 1  $\mu$ l および酵素に付属のバッファーで、総反応溶液

量は100  $\mu$ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー社）を用い、95℃・1分、55℃・1分、72℃・1分のサイクルを30回繰り返した。Taq DNA polymerase を添加する前に、残りの反応液を混合し、95℃・5分、65℃・5分の加熱を行った。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色によって行った。

### 【0066】

【実施例2】PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規レセプター蛋白質候補クローンの選択

実施例1で行なったPCR後の反応産物は0.8%の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>II（TMは登録商標を意味する）へサブクローニングした。これを大腸菌INV $\alpha$ F' competent cell（インビトロゲン社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）INV $\alpha$ F' / p19P2を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置（クラボウ社）を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロフォルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の情報はDNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いて行った。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

決定した塩基配列〔配列番号：24（図1の塩基配列から下線部分を除いた塩基配列）および配列番号：25（図2の塩基配列から下線部分を除いた塩基配列）

)] をもとにホモロジー検索を行なった結果、形質転換体 E. Coli INV  $\alpha F'$  / p19P2 の保有するプラスミド p19P2 に挿入された cDNA 断片が新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。それをさらに確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した [配列番号: 19 (図1のアミノ酸配列から下線部分を除いたアミノ酸配列) および配列番号: 20 (図2のアミノ酸配列から下線部分を除いたアミノ酸配列)]。疎水性プロット [図3および図4] およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、ニューロペプチド Y 受容体等との相同性を見いだした [図5]。

#### 【0067】

【実施例3】マウス膵臓  $\beta$  細胞株 MIN 6 からの poly(A)<sup>+</sup>RNA 画分の調製および cDNA の合成

マウス膵  $\beta$  細胞株 MIN 6 (Jun-ichi Miyazaki et al. Endocrinology, Vol. 127, No.1, p126-132) よりグアニジンイソチオシアネート法により Total RNA を調製後 (Kaplan B.B. et al., Biochem. J. 183, 181-184 (1979))、mRNA 精製キット (ファルマシア社) を用いて、poly(A)<sup>+</sup>RNA 画分を調製した。次に、poly(A)<sup>+</sup>RNA 画分 5  $\mu$ g にプライマーとしてランダム DNA ヘキサマー (BRL 社) を加え、モロニイマウス白血病ウイルスの逆転写酵素 (BRL 社) により、添付バッファーを用いて相補 DNA を合成した。反応後の産物はフェノール:クロロホルム (1:1) で抽出し、エタノール沈殿を行った後、30  $\mu$ l の TE に溶解した。

#### 【0068】

【実施例4】MIN 6 由来 cDNA を用いた PCR 法による受容体 cDNA の増幅と塩基配列の決定

実施例3でマウス膵  $\beta$  細胞株 MIN 6 より調製した cDNA 5  $\mu$ l を鋳型として使用し、参考例1で合成した DNA プライマーを用いて実施例1と同条件で PCR 法を行った。得られた PCR 産物は実施例2に記載の方法と同様にして、プラスミドベクター pCR<sup>TM</sup>II にサブクローニングし、プラスミド pG3-2 を得た。このプラスミドで大腸菌 INV  $\alpha F'$  を形質転換し、形質転換体エシェリ

ヒア コリ (*Escherichia coli*) INV $\alpha$ F' / pG3-2 を得た。

また、マウス脾 $\beta$ 細胞株MIN6より調製したcDNA 5 $\mu$ lを鋳型として使用し、Libert, Fら (Science 244:569-572, 1989) に記載されている合成DNAプライマー、すなわち、

5'-CTGTG (CまたはT) G (CまたはT) (GまたはC) AT (CまたはT) GC I IT (GまたはT) GA (CまたはT) (AまたはC) G (GまたはC) TAC-3' (配列番号: 31)

〔Iはイノシンを示す。〕で表される合成プライマーおよび

5'-A (GまたはT) G (AまたはT) AG (AまたはT) AGGGCAGC CAGCAGAI (GまたはC) (AまたはG) (CまたはT) GAA-3' (配列番号: 32)

〔Iをイノシンを示す。〕で表される合成プライマーを用いて、実施例1と同条件でPCR法を行った。得られたPCR産物は実施例2に記載の方法と同様にし、プラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIにサブクローニングし、プラスミドpG1-10を得た。

【0069】

塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の情報はDNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用いて行った。pG3-2およびpG1-10の配列をもとにマウス脾 $\beta$ 細胞株MIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 27) およびこれにコードされるアミノ酸配列 (配列番号: 22) を〔図6〕に示した。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

決定した塩基配列〔図6〕をもとにホモロジー検索を行なった結果、得られたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。それをさらに確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後〔図6〕、疎水性プロットを行なったところ、6個の疎水性領域の存在が確認できた〔図8〕。また、アミノ酸配列を実施例2で得たp19P2と比較したところ、〔図7〕に示すとおり

高い相同性を見いだした。その結果、pG3-2およびpG1-10にコードされるマウス脾β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質とヒト下垂体由来p19P2にコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質は由来する動物種は異なるが、同一のリガンドを認識するレセプター蛋白質であることが強く示唆された。

#### 【0070】

【実施例5】ヒト下垂体由来cDNAライブラリーからのレセプター蛋白質の全コード領域を含むcDNAのクローニング

ヒト下垂体由来cDNAライブラリーとしては、クローンテック社製のλgt11ファージベクターを使ったライブラリーを用いた（クローンテック、CLH L1139b）。 $2 \times 10^6$  pfu（プラーク・フォーミング・ユニット）分のヒト下垂体cDNAライブラリーを、硫酸マグネシウムで処理した大腸菌Y1090<sup>-</sup>と混ぜ、37℃、15分間インキュベートした後、0.5%アガロース（ファルマシア社）LBを加え、1.5%寒天（和光純薬社）LBプレート（50 μg/ml Ampicilin含有）に播いた。プラークのできたプレートにニトロセルロースフィルターを置き、フィルター上にプラークを転写した。このフィルターをアルカリ処理することによって変性させた後、80℃、3時間の加熱によってDNAの固定を行った。

このフィルターを、50% formamide, 5×SSPE, 5× Denhardt's溶液, 0.1% SDS, 100 μg/ml salmon sperm DNAを含むバッファー中で以下に述べるプローブと42℃で一晩インキュベートし、ハイブリダイズさせた。プローブとしては、実施例2で得られたプラスミドp19P2に挿入されたDNA断片をEcoRIで切断し、回収後、ランダムプライムDNAラベリングキット（アマシャム社）を用いて [<sup>32</sup>P] dCTP（デュポン社）を取り込ませることによって標識して用いた。洗浄は、2×SSC, 0.1% SDSで55℃、1時間行い、その後、-80℃でオートラジオグラフィを行ってハイブリダイズするプラークを検出した。

#### 【0071】

このスクリーニングにより、3個の独立したプラークにハイブリダイゼーショ

ンのシグナルが認められた。この3個のクローンからそれぞれDNAを調製し、EcoRIで消化したものをアガロース電気泳動後、スクリーニングに用いたものと同じプローブを用いて、サザンブロットにより解析を行ったところ、各々約0.7 kb, 0.8 kb, 2.0 kbのところにそれぞれハイブリダイズするバンドを生じ、このうち約2.0 kbのバンドを生じるもの(λhGR3)を選択した。λhGR3のハイブリダイズするサイズのEcoRI断片をプラスミドpUC18のEcoRIサイトにサブクロニングした後、このプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、形質転換体 E. coli JM109/p hGR3を得た。このプラスミドp hGR3を、実施例2で示された塩基配列から予想される制限酵素地図をもとにして制限酵素地図を作製したところ、実施例2で示されるレセプター蛋白質をコードするDNAから予想されるレセプター蛋白質の全長をコードするDNAを保持していることが分かった。

#### 【0072】

##### 【実施例6】ヒト下垂体由来レセプター蛋白質cDNAの塩基配列の決定

実施例5で得られたプラスミドp hGR3に挿入したEcoRI断片のうち、レセプター蛋白質をコードしていると考えられるEcoRIサイトからNheIサイトまでの約1330 bpの塩基配列を決定した。具体的には、EcoRI断片中に存在する制限酵素サイトを利用して、不必要な部分を除き、または必要な断片をサブクロニングし、配列解析のための鑄型プラスミドを調製した。

塩基配列決定のための反応は Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式DNAシーケンサー (ABI社)を用いて解読し、データー解析にはDNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング社)を使用した。

p hGR3のコードするEcoRIサイト直後からNheIサイトまでの塩基配列を〔図9〕に示した。そして、ヒト下垂体由来レセプタータンパク質をコードするDNAの塩基配列は、〔図9〕の塩基配列の第118番目～第1227番目の塩基配列(配列番号:26)に対応する。そして、これにコードされるレセプター蛋白質のアミノ酸配列は配列番号:21で表わされるアミノ酸配列であることが分かった。

## 【0073】

【実施例7】ヒト下垂体由来レセプター蛋白質をコードする p h G R 3 を用いたノーザンハイブリダイゼーション

実施例5で得られたプラスミド p h G R 3 にコードされるヒト下垂体由来レセプター蛋白質の下垂体での発現を mRNA レベルで検出するため、ノーザンブロットを行った。mRNA としてはヒト下垂体 mRNA (クローンテック社) 2.5  $\mu$ g を用い、プローブは実施例5で用いたものと同じものを用いた。また、ノーザンブロット用のフィルターは、Nylon membrane (Pall Biodyne, U.S.A.) を用い、mRNA の泳動フィルターへの吸い上げは Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) の方法に従って作製した。ハイブリダイゼーションは、上に述べたフィルターとプローブを 50% formamide, 5 $\times$ SSPE, 5 $\times$ Denhardt's 溶液, 0.1% SDS, 100  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA を含むバッファー中で、42 $^{\circ}$ C 一晚インキュベートした。フィルターの洗浄は 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS で 50 $^{\circ}$ C にて行い、風乾後3日間-80 $^{\circ}$ C で X 線フィルム (XAR 5, コダック) に感光させた。その結果を【図10】に示した。【図10】から、p h G R 3 がコードするレセプター遺伝子はヒト下垂体で発現していると考えられる。

## 【0074】

【実施例8】MIN 6 由来 cDNA を用いた PCR 法による受容体 cDNA の増幅と塩基配列の決定

実施例3でマウス脾 $\beta$ 細胞株MIN 6より調製した cDNA 5  $\mu$ l を鋳型として使用し、実施例4で合成した Libert, F. ら (Science 244:569-572, 1989) に記載されている合成 DNA プライマー、すなわち、

5'-CTGTG (CまたはT) G (CまたはT) (GまたはC) AT (CまたはT) GC I I T (GまたはT) GA (CまたはT) (AまたはC) G (GまたはC) TAC-3' (配列番号: 31)

〔I はイノシンを示す。〕で表される合成プライマーおよび

5'-A (GまたはT) G (AまたはT) AG (AまたはT) AGGGCAGC CAGCAGAI (GまたはC) (AまたはG) (CまたはT) GAA-3'

(配列番号：32)

〔Iをイノシンを示す。〕で表される合成プライマーを用いて、実施例1と同条件でPCR法を行った。得られたPCR産物は実施例2に記載の方法と同様にし、プラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIにサブクローニングし、プラスミドp5S38を得た。このプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/p5S38を得た。

【0075】

塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の情報はDNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用いて行った。p5S38の配列をもとにマウス脾β細胞株MIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列(配列番号：28)およびこれにコードされるアミノ酸配列(配列番号：23)を〔図12〕に示した。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

決定した塩基配列〔図12〕をもとにホモロジー検索を行なった結果、得られたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。それをさらに確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後〔図12〕、疎水性プロットを行なったところ、4個の疎水性領域の存在が確認できた〔図14〕。また、アミノ酸配列を実施例2で得たp19P2および実施例4で得たpG3-2と比較したところ、〔図13〕に示すとおり高い相同性を見いだした。その結果、p5S38にコードされるマウス脾β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質とp19P2にコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、由来する動物種は異なるが、同一のリガンドを認識するレセプター蛋白質であることが強く示唆された。また、p5S38にコードされるマウス脾β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質とpG3-2およびpG1-10にコードされるマウス脾β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、同一のリガンドを認識するレセプター蛋白質であり、互いに近縁なレセプター蛋白質(いわゆる、サブタイプ)であることが示唆された。



【0076】

## 【実施例9】 p h G R 3 発現CHO細胞の作製

ヒト下垂体由来レセプター蛋白質の全長アミノ酸配列をコードするcDNAを組み込んだプラスミド p h G R 3 (実施例5) を制限酵素Nco I で切断し、アガロースゲル電気泳動後に約1kbの断片を回収した。回収した断片の両端をDNA bluntin g kit (宝酒造) を用いて平滑化した後、Sal I リンカーを付加しさらにSal I で処理した後、pUC119のSal I siteに組み込んでプラスミドS10を得た。S10をSal I およびSac IIで処理することにより約700bpの断片(N末端側のコード領域を含む)を調製した。次にp h G R 3 よりSac II およびNhe I で切り出される約700bpの断片(終始コドンを含むC末端側コード領域を含む)を調製した。これらの2つの断片をSal I およびNhe I 処理した動物細胞発現用ベクタープラスミド p A K K O - 1 1 1 H (Biochim. Biophys. Acta, Hinuma, S., et al. 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKK01.11Hと同一のベクタープラスミド)に加えてligati onを行い全長レセプター蛋白質発現用プラスミド p A K K O - 1 9 P 2 を構築した。

p A K K O - 1 9 P 2 で形質転換した大腸菌を培養後、Q U I A G E N Maxiによって大量にp A K K O - 1 9 P 2 のプラスミドDNAを調製した。そのうち20  $\mu$  gのプラスミドDNAを1mlの滅菌P B Sに溶解した後、ジーントランスファー(和光純薬)のバイアルに入れ、十分にボルテックスを行うことによってリボソームの形成を行わせた。24時間前に直径10cmシャーレに $1 \times 10^6$ 個ずつ継代し、直前に新鮮な培地に交換したC H O dhfr<sup>-</sup>細胞に125  $\mu$  lのリボソーム溶液を添加し、一晚培養した。新鮮な培地に交換してさらに一日培養した後、選択培地に交換して1日間培養した。形質転換体を効率良く選別するために、低細胞密度で継代を行い、選択培地中で増殖してくる細胞のみを選択し、全長レセプター蛋白質発現CHO細胞株 C H O - 1 9 P 2 を樹立した。

【0077】

【実施例10】 C H O - 1 9 P 2 細胞株での全長レセプター蛋白質の発現量の転写レベルでの確認

Fast Track kit (Invitrogen社) を用い、キットの処方にしたがって p A K K

O-19P2を導入して形質転換したCHO細胞とmock CHO細胞からpoly(A)<sup>+</sup>RNAを調製した。このpoly(A)<sup>+</sup>RNAを0.02 $\mu$ g用い、RNA PCR Kit (宝酒造)を用いてcDNAの合成を行った。用いたプライマーの種類はrandom 9merで、反応液の全容量は40 $\mu$ lとした。また、cDNA合成のネガティブコントロールとして、リバーストランスクリプターゼを添加しない反応液も準備した。最初、30℃で10分間のインキュベーションを行ってプライマーからの伸長反応をある程度行わせた。その後、42℃で30分間インキュベーションして十分に逆転写反応を進行させ、99℃で5分間加熱して酵素を失活し、さらに5℃で5分間冷却した。

逆転写反応終了後に反応液の一部を回収し、蒸留水で希釈した後、フェノール/クロロフォルム抽出、ジエチルエーテル抽出を行った。これをエタノール沈殿し、一定量の蒸留水に溶解したものをcDNAの試料とした。このcDNA溶液およびプラスミドDNA (pAKKO-19P2)を段階的に希釈したものを作成し、全長レセプター蛋白質に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。全長レセプター蛋白質のコード領域の塩基配列に基づいて作成したプライマーの配列は、5'側がCTGACTTATTTTCTGGGCTGCCGC (配列番号: 33)、3'側がAACACCGACACATAGACGGTGACC (配列番号: 34)である。

PCR反応は、プライマー各1 $\mu$ MおよびTaq DNA polymerase (宝酒造) 0.5 $\mu$ l、酵素に添付の反応バッファーおよびdNTPsと10 $\mu$ lの鋳型DNA (cDNAあるいはプラスミド溶液)を用いて全容量100 $\mu$ lで行った。最初に94℃で2分間熱処理を行って鋳型DNAの変性を十分に行った後に、95℃で30秒、65℃で30秒、72℃で60秒のサイクルを25回行った。反応終了後に10 $\mu$ lの反応液を用いてアガロースゲル電気泳動を行い増幅産物の検出および量的な比較を行った。その結果全長レセプター蛋白質をコードするcDNAの配列から推定される大きさ(400bp)のPCR産物が、検出された〔図15〕。リバーストランスクリプターゼを添加しなかった逆転写反応産物を鋳型として用いたPCR反応液のレーンに特異的なバンドは検出されず、CHO細胞のゲノムDNA由来のPCR産物である可能性は除外され、また、mock細胞のレーンにも特異的なバンドが出現しないことから、CHO細胞にもとから発現しているmRNA由来ではないことが確認さ

れた〔図15〕。

【0078】

【実施例11】ラット全脳抽出液に含まれるCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性の検出

ラット全脳よりペプチド粗画分を以下の方法で調整した。屠殺後、直ちに摘出したラット全脳を液体窒素にて凍結、-80℃にて保存した。凍結保存したラット全脳20g(ラット10匹分)を細かく碎き、蒸留水80mlで10分間煮沸した。煮沸後、氷上にて急冷し、終濃度 1.0M となるよう酢酸を4.7ml加え、ポリトロン(20,000 rpm、6min)を用いてホモジナイズした。ホモジェネートは、一晚攪拌した後、遠心(10,000rpm、20min)により上清をとり、沈殿物を1.0M酢酸40mlでホモジナイズし遠心にて再度上清を得た。上清をまとめ、3倍量のアセトンを加え、氷上に30分間放置した後遠心(10,000rpm、20min)にて上清を回収した。回収したアセトン上清は、エバポレーションにて脱アセトン、濃縮を行った。濃縮された脱アセトン上清に、2倍量の0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)/H<sub>2</sub>Oを加え、ガラス製カラムに詰めた逆相C18カラム(Prep C18 125Å 10ml:ミリポア)に添加した。上清を添加後、0.05%TFA/H<sub>2</sub>O でカラムを洗浄、10%、20%、30%、40%、50%、60% CH<sub>3</sub>CN/0.05%TFA/H<sub>2</sub>O で段階的に溶出し、それぞれの画分を10等分して凍結乾燥した。1匹分の全脳由来の乾燥標品を、ジメチルスルホキシド(DMSO)20μlにて溶解し、0.05%ウシ血清アルブミン(BSA)を加えたハンクス氏液(HBSS)1mlに懸濁し、ペプチド粗画分とした。

全長レセプター蛋白質発現CHO細胞およびmock CHO細胞を、24well plateに0.5x10<sup>5</sup>cells/wellで播種し、24時間培養後、[<sup>3</sup>H]アラキドン酸を0.25μCi/well となるよう添加した。[<sup>3</sup>H]アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05%BSAを含むHBSSで洗浄、上述のペプチド粗画分を400μl/wellで添加した。37℃で30分間インキュベートした後に、反応液400μl中300μlをシンチレーター4mlに加え、反応液中に遊離された[<sup>3</sup>H]アラキドン酸代謝物の量をシンチレーション・カウンターによりモニターした。その結果、30%CH<sub>3</sub>CNの溶出画分に全長レセプター蛋白質発現CHO細胞(CHO-19P2)特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が検出された〔図16〕。

【0079】

【実施例12】 ウシ視床下部抽出液に含まれるCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性の検出

実施例11と同様の方法でウシ視床下部を含む脳組織片360g(10頭分)よりペプチド粗画分を調製した。0.5頭分由来の乾燥ペプチド標品を40 $\mu$ lのDMSOに溶解し、0.05%BSAを含む2mlのHBSSに懸濁し、実施例11と同様の方法でアラキドン酸代謝物遊離活性の検出を試みた。その結果、ウシ視床下部ペプチド粗画分のC18カラム30%CH<sub>3</sub>CN溶出画分に、CHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された〔図17〕。

【0080】

【実施例13】 ウシ視床下部からのCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性物質(ペプチド)の精製

CHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性物質についてウシ視床下部から精製した代表例を以下に具体的に述べる。視床下部を含む凍結脳組織片4.0kg(80頭分)を小片化し、蒸留水8.0L中で20分間煮沸した。氷上にて急冷した後、終濃度1.0Mとなるように酢酸540mlを加え、ポリトロン(10,000rpm、12min)にてホモジナイズした。ホモジェネートを一晩攪拌した後、遠心(9,500rpm、20min)にて上清を得た。沈殿物は1.0M酢酸4.0Lに懸濁し、ポリトロンにてホモジナイズし遠心にて再度上清を得た。上清を一つにまとめ、終濃度0.05%となるようにTFAを加え、ガラス製カラムに詰めた逆相C18カラム(Prep C18 125Å 160ml:ミリポア)に添加した。添加後、0.05%TFA/H<sub>2</sub>O 320mlでカラムを洗浄後、10%、30%、50% CH<sub>3</sub>CN/0.05%TFA/H<sub>2</sub>Oで3段階に溶出した。30% CH<sub>3</sub>CN/0.05%TFA/H<sub>2</sub>O 溶出画分に2倍量の20mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>Oを加え、陽イオン交換カラム HiPrep CM-Sepharose FF (Pharmacia)に添加した。20mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/10% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>Oでカラムを洗浄後、100mM、200mM、500mM、1000mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>/10% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>Oで4段階に溶出した。200mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 溶出画分にCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が見いだされたので、この溶出画分に3倍量のアセトンを加え、遠心して除タンパク質を行った後、エバポレーションによる濃縮を行った。濃縮された画分にTFA(終濃度0.1%)

を加えた後さらに 酢酸を加えて pH4 に調製し、逆相カラム RESOURCE RPC 3ml (Pharmacia) に添加した。15%-30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  濃度勾配による溶出で、19%-21%  $\text{CH}_3\text{CN}$  の画分に CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された。RESOURCE RPC の活性画分を 凍結乾燥後、DMSO で溶解したのち、50mM MES pH5.0/10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  に懸濁し、陽イオン交換カラム RESOURCE S 1ml (Pharmacia) に添加した。0M-0.7M NaCl 濃度勾配による溶出で、0.32M-0.46M NaCl の画分に CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された。RESOURCE S の活性画分を 凍結乾燥後、DMSO に溶解したのち、0.1%TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  に懸濁し、逆相カラム C18 218TP5415 (Vydac) に添加した。20%-30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  濃度勾配による溶出で、22.5%、23%、23.5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  の3つの画分（活性画分をそれぞれ P-1、P-2、P-3 とする）にそれぞれ CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された〔図18〕。3つに分離した活性のうちの 23.5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  の画分 (p-3) を凍結乾燥後、DMSO で溶解したのち、0.1%TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  に懸濁し、逆相カラム diphenyl 219TP5415 (Vydac) に添加した。22%-25%  $\text{CH}_3\text{CN}$  濃度勾配による溶出で、23%  $\text{CH}_3\text{CN}$  で溶出される1つのピークに CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性は収束した〔図19〕。逆相カラム diphenyl 219TP5415 で活性と一致したピークの画分を凍結乾燥後、0.1%TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  に懸濁し、逆相カラム  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 (Pharmacia) に添加した。22%-23.5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  濃度勾配による溶出で 23.0% と 23.2%  $\text{CH}_3\text{CN}$  で溶出される二つのピークにそれぞれ CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された〔図20〕。

#### 【0081】

【実施例14】 ウシ視床下部から精製した CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性ペプチドのアミノ酸配列決定

実施例13で精製された CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性ペプチド(P-3)のアミノ酸配列の決定を行った。逆相カラム  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 で活性と一致したピークの画分を凍結乾燥後、70%  $\text{CH}_3\text{CN}$  20  $\mu$ l に溶解し、ペプチドシーケンサー (ABI.491) によるアミノ酸

配列の分析を行った。その結果、配列番号：3が得られた。ただし、7番目と19番目の配列はアミノ酸配列の分析のみでは決定されていない。

【0082】

【実施例15】ウシ視床下部からのCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性物質（ペプチド）の精製

実施例13において Vydac C18 218TP5415 で分離された3つの活性のうち23.0% CH<sub>3</sub>CNの活性画分（P-2）のさらなる精製を行った。この活性画分を凍結乾燥後、DMSOで溶解したのち0.1% TFA/蒸留水に懸濁し、逆相カラムdiphenyl 219TP5415（Vydac）に添加した。21.0% - 24.0% CH<sub>3</sub>CN濃度勾配による溶出で、21.9% CH<sub>3</sub>CNで溶出される一つのピークにCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された。この画分を凍結乾燥後、DMSOで溶解したのち0.1% TFA/蒸留水に懸濁し、逆相カラムμRPC C2/C18 SC 2.1/10（Pharmacia）に添加した。21.5% - 23.0% CH<sub>3</sub>CN濃度勾配による溶出で、22.0% CH<sub>3</sub>CNで溶出される一つのピークにCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が収束した〔図21〕。

【0083】

【実施例16】ウシ視床下部から精製されたCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するペプチド（P-2）のアミノ酸配列決定

実施例15で精製されたCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するペプチド（P-2）のアミノ酸配列の決定を行った。逆相カラムμRPC C2/C18 SC 2.1/10で活性と一致したピークの画分を凍結乾燥後、70% CH<sub>3</sub>CN 20μlに溶解し、ペプチドシーケンサー（ABI, 492）によるアミノ酸配列の分析を行った（配列番号：4）。

【0084】

【実施例17】ウシ視床下部からの poly(A)<sup>+</sup>RNA画分の調製およびcDNAの合成

ウシ1頭分の視床下部より Isogen（ニッポンジーン社）により total RNA

を調製後、FastTrack (Invitrogen社) を用いて poly(A)<sup>+</sup>RNA 画分を調製した。次にこの poly(A)<sup>+</sup>RNA 画分 1  $\mu$ g から、3' RACE system (GIBCO BRL) および Marathon cDNA amplification kit (Clontech) により、マニュアルに従って cDNA を合成し、それぞれ 20 および 10  $\mu$ l に溶解した。

#### 【0085】

【実施例 18】 実施例 14 で明らかとなったアミノ酸配列部分をコードする cDNA の取得

実施例 14 で明らかとなったアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする cDNA を取得するため、まず配列番号：1 をコードする塩基配列の取得をめざした。そこでプライマー P5-1 (配列番号：35)、P3-1 (配列番号：36)、P3-2 (配列番号：37) を合成した (配列表において I はイノシンを示す)。実施例 17 で 3' RACE system を用いて調製した cDNA 0.5  $\mu$ l を鋳型として、DNA polymerase として EX Taq (宝酒造) を用い、添付のバッファー 2.5  $\mu$ l、dNTP 200  $\mu$ M と、プライマー P5-1、P3-1 をそれぞれ 200 nM となるように加水で 25  $\mu$ l として、94℃・1 分後、98℃・10 秒、50℃・30 秒、68℃・10 秒のサイクルを 30 回繰り返した。この反応液をトリシン・EDTA バッファーで 50 倍に希釈したもの 2.5  $\mu$ l を鋳型として、プライマーを P5-1 と P3-2 に組み合わせに換え、その他は同じ条件で反応を行った。サーマルサイクラーは GeneAmp9600 (パーキンエルマー社) を用いた。増幅産物を 4% アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約 70 bp のバンドを切り出し、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿した。回収した DNA を TA クローニングキット (Invitrogen) のマニュアルに従い、プラスミドベクター pCR<sup>TM</sup>II へサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 に導入して、得られた形質転換体をアンピシリンを含む LB 培地で培養後、自動プラスミド抽出器 (クラボウ) でプラスミドを調製した。このプラスミドを Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) でマニュアルに従い反応し、蛍光自動 DNA シーケンサー (ABI) により解読した。その結果 [図 22] に示す配列が得られ、これが配列番号：1 をコードする塩基配列の一部であることを確認した。

【0086】

【実施例19】実施例18で明らかになった配列を用いてのRACE法による生理活性ポリペプチドcDNAの取得

まず5'側の配列を増幅する(5' RACE)のために〔図22〕に示した配列を利用してPE(配列番号:38)とPDN(配列番号:39)の2本のプライマーを合成した。実施例17で Marathon cDNA amplification kit により調製したcDNAをトリシン・EDTAバッファーで100倍に希釈したもの2.5 $\mu$ lを鋳型として、実施例2と同様の方法で反応液を調製し、キット添付のアダプタープライマーAP1とPEの組み合わせで、94℃・1分後、98℃・10秒、68℃・5分のサイクルを30回繰り返した。さらにこの反応液をトリシン・EDTAバッファーで50倍に希釈したもの2.5 $\mu$ lを鋳型として、プライマーをAP1とPDNの組み合わせに換え、94℃・1分後、98℃・10秒、72℃・5分のサイクルを4回、98℃・10秒、70℃・5分のサイクルを4回、98℃・10秒、68℃・5分のサイクルを26回繰り返した。増幅産物を1.2%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約150bpのバンドを切り出し、遠心濾過チューブ(ミリポア社)で遠心濾過後、フェノール抽出、エタノール沈殿した。回収したDNAをTAクローニングキット(Invitrogen)のマニュアルに従い、プラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIへサブクローニングした。これを大腸菌JM109に導入して、得られた形質転換体を実施例18と同様の方法で挿入されたcDNA断片の配列を解析した。その結果、〔図23〕に示す配列が得られた。さらにこの配列を基にプライマーFB(配列番号:40)、FC(配列番号:41)を合成し、3'側の配列取得を行った(3' RACE)。鋳型は5' RACEと同じものを同量用い、キット添付のアダプタープライマーAP1とFCの組み合わせで、94℃・1分後、98℃・10秒、72℃・5分のサイクルを5回、98℃・10秒、70℃・5分のサイクルを5回、98℃・10秒、68℃・5分のサイクルを25回繰り返した。さらにこの反応液をトリシン・EDTAバッファーで50倍に希釈したもの2.5 $\mu$ lを鋳型として、プライマーを、やはりキット添付のAP2とFBの組み合わせに換え、94℃・1分後、98℃・10秒、72℃・5分のサイクルを4回、98℃・10秒、



70℃・5分のサイクルを4回、98℃・10秒、68℃・5分のサイクルを27回繰り返した。増幅産物を1.2%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約400bpのバンドを切り出し、5' RACEのときと同様の方法でDNAを回収した。このDNA断片をプラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIへサブクローニング後、大腸菌JM109に導入して、得られた形質転換体に挿入されたcDNA断片の配列を解析した。5'および3' RACEの結果から、配列番号：1に示した生理活性ポリペプチドの全コード領域をコードするcDNA配列〔図24〕を得た。具体的には、図24(a)および(b)において、第134番目の塩基がGのものであって、第184番目の塩基がTおよびCのもの、第245番目の塩基がTおよびCのものが得られた。

## 【0087】

図24に示したcDNAは98アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。第1から第22番目のアミノ酸が疎水的なアミノ酸が集合していることと実施例14に示したように活性ペプチドのN末端が第23番目のSerから始まっていることを考え合わせると、第1から22番目のアミノ酸は分泌シグナルの配列であると推定された。一方、ポリペプチドの第54番目から57番目に存在するGlyArgArgArg配列は生理活性ペプチドが切断される場合に存在する典型的なアミノ酸配列モチーフであることが分かった。またこの切断モチーフの場合にはGlyが存在するためしばしば生成するペプチドのC末端はアミド化されることが知られている。

実施例14のP-3のN末端配列および実施例16のP-2のN末端配列情報とこのGlyArgArgArg配列を考え合わせるとこのcDNAにコードされるポリペプチドから切り出されてくる生理活性ペプチドの少なくとも一部は配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9もしくは配列番号：10であると考えられた。

## 【0088】

【実施例20】PCR法によるウシ型生理活性ポリペプチドcDNAの全コード領域を含むDNA断片の取得

実施例17で Marathon cDNA amplification kit により調製したcDNAを

鋳型として生理活性ポリペプチド cDNA の全コード領域を含む DNA 断片の取得を行った。まず実施例 19 で明らかとなった cDNA の配列を基に、配列番号：42、配列番号：43 で表される塩基配列を有するプライマーを 2 本合成した。

BOVF

5'-GTGTCGACGAATGAAGGCGGTGGGGGCCTGGC-3' (配列番号：42)

BOVR (24mer)

5'-AGGCTCCCGCTGTTATTCCTGGAC-3' (配列番号：43)

BOVF は生理活性ポリペプチド cDNA のスタートコドンを含み、制限酵素 *Sa* I 部位を付加した -2 ~ +22 (スタートコドン ATG の A を +1 とする) に対応するセンス配列で、BOVR は生理活性ポリペプチド cDNA のストップコドンを含む +285 ~ +309 に対応するアンチセンス配列である。

PCR 反応は実施例 17 で Marathon cDNA amplification kit により調製した cDNA をトリシン・EDTA バッファーで 100 倍に希釈したもの 2.5  $\mu$ l を鋳型として、実施例 2 と同様の方法で反応液を調製し、94℃・1 分後、98℃・10 秒、72℃・5 分のサイクルを 3 回、98℃・10 秒、70℃・5 分のサイクルを 3 回、98℃・10 秒、68℃・5 分のサイクルを 27 回繰り返した。増幅産物を 2% アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約 320 bp のバンドを切り出し、実施例 3 と同様の方法で DNA を回収、プラスミドベクター pCR<sup>TM</sup> II ヘサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 に導入して、形質転換体 *Escherichia coli* JM109 / pBOV3 を得た。得られた形質転換体に挿入された cDNA 断片の配列を解析した。その結果この DNA 断片は生理活性ポリペプチド cDNA の全コード領域を含む断片であることが確認された。

【0089】

【実施例 21】 Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (

19P2-L31)の合成。

1) Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Ala-His(Bom)-Gln-His(Bom)-Ser(Bzl)-Met-Glu(OcHex)-Ile-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resinの合成。

市販p-メチルBHA樹脂(アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製)0.71g(0.5 mmole)をペプチド合成機(アプライド バイオシテムズ社製430A)の反応器に入れ、DCMで膨潤させた後、最初のアミノ酸Boc-PheをHOBt/DCC法で活性化しp-メチルBHA樹脂に導入した。樹脂を50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、DIEAで中和した。このアミノ基に次のアミノ酸Boc-Arg(Tos)をHOBt/DCC法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-Pro、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Gly、Boc-Arg(Tos)、Boc-Gly、Boc-Ala、Boc-Tyr(Br-Z)を順次縮合、ニンヒドリンテストで縮合が不十分であると判明したBoc-Ala、Boc-Tyr(Br-Z)は再縮合し反応を完了した。樹脂を乾燥して半量の樹脂を取り出した残りに、Boc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Glu(OcHex)、Boc-Met、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Gln、Boc-His(Bom)、Boc-Ala、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)を同様にニンヒドリンテストで十分な縮合が得られるまで再縮合をくり返した。19P2-L31の全配列アミノ酸が導入され樹脂を50%TFA/DCMで処理し樹脂上のBoc基を除去後、樹脂を乾燥し1.28gのペプチド樹脂を合成した。  
【0090】

2) Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>(19P2-L31)の合成。

1) で得た樹脂をp-クレゾール3.8g、1,4-ブタンジチオール1ml、弗化水素10mlと共にテフロン製弗化水素反応装置中で0℃ 60分間反応した。弗化水素、1,4-ブタンジチオール1mlを減圧留去し、残留物にジエチルエーテル100mlを加え攪拌後、グラスフィルター上に濾取、乾燥した。これを50%酢酸水溶液50ml

中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約5mlまでに濃縮した後、セファデックスG-25 (2 x 90 cm) のカラムに付し50%酢酸水で展開し114 ml~181 mlの画分を集め凍結乾燥し、19P2-L31を含む白色粉末290 mgを得た。これをLiChroprep RP-18 (MERCK社製) を充填した逆相系カラムにつけ0.1% TFA水と0.1% TFA含有30%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度25%前後に溶出される部分を集め凍結乾燥し、白色粉末71 mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3574.645

HPLC溶出時間 18.2分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0091】

【実施例22】 Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met(O)-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (19P2-L31 (O)) の合成。

合成19P2-L31 6mgを5%-酢酸水溶液20mlに溶解し30%-過酸化水素水40μlを加えMet部分のみを酸化し、反応終了後直ちにLiChroprep RP-18 (MERCK社製) を充填した逆相系カラムにつけて精製し目的物 5.8mgをえた。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3590.531

HPLC溶出時間 17.9分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0092】

【実施例23】 Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (19P2-L20) の合成。

実施例21の1) でBoc-Tyr(Br-Z)までを縮合した樹脂にさらにBoc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)を同様に縮合し、Boc-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin

1.14gを得た。これを実施例21の2)と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末60mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2242.149

HPLC溶出時間 10.4分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有15%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有45%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (15分)

流速: 1.0 ml/分

【0093】

【実施例24】 合成ペプチド (19P2-L31) によるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定

実施例11と同様に、実施例21で合成されたペプチド (19P2-L31) によるCHO-19P2細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に10<sup>-3</sup>Mの濃度で溶解し、0.05%BSAを含むHBSSで希釈して、それぞれの濃度におけるCHO-19P2細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を [<sup>3</sup>H] アラキドン酸代謝物の量を指標に測定した。その結果、10<sup>-12</sup>M~10<sup>-6</sup>Mで濃度依存的なアラキドン酸代謝物遊離の活性が検出された [図25]。さらに、実施例22で合成された1

9 P 2 - L 3 1 のメチオニン酸化体であるペプチド 1 9 P 2 - L 3 1 (O) について 1 9 P 2 - L 3 1 とのアラキドン酸代謝物遊離活性の比較を行った結果、〔図 2 6〕に示すように 1 9 P 2 - L 3 1 (O) は 1 9 P 2 - L 3 1 と同等の活性を示すことが分かった。

#### 【0094】

【実施例 2 5】合成ペプチド (1 9 P 2 - L 2 0) によるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定

実施例 1 1 と同様に、実施例 2 3 で合成された天然品 P - 2 に相当するペプチド (1 9 P 2 - L 2 0) による CHO - 1 9 P 2 細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に  $10^{-3}$  M の濃度で溶解し、0.05% BSA を含む HBSS で希釈して、それぞれの濃度における CHO - 1 9 P 2 細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を [ $^3$ H] アラキドン酸代謝物の量を指標に測定した。

その結果、 $10^{-12}$  ~  $10^{-6}$  M で濃度依存的なアラキドン酸代謝物遊離の活性が 1 9 P 2 - L 3 1 とほぼ同程度に検出された〔図 2 7〕。

#### 【0095】

【実施例 2 6】ウシゲノム DNA におけるコード領域の塩基配列の解析

pBOV3 を制限酵素 EcoRI で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、cDNA 断片部分の DNA を回収してプローブを調製した。これをマルチプライム DNA ラベリングキット (アマシャム社) を用いて  $^{32}$ P 標識した。クローニングベクター EM BL3 SP6/T7 を用いて構築した Bovine Genomic Library (CLONTECH 社 BL1015j) の約  $2.0 \times 10^6$  個のファージを大腸菌 K802 を宿主として LB 寒天培地プレートに播種し、一晚培養してプラークを形成させた。これをニトロセルロースフィルターに転写し、アルカリ変性、中和処理を行った後、熱処理 (80°C、2 時間) によって DNA を固定化した。このフィルターを 50%ホルムアミドを含むハイブリバッファー (50%formamide、5×Denhardt's 溶液、4×SSPE、0.1mg/ml Salmon sperm DNA、0.1%SDS) 中で標識プローブと 42°C で一晚インキュベーションし、ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後のフィルターを室温で 2×SSC、0.1%SDS 中で 1.5 時間洗浄した後、さらに 55°C の同バッファー中で 30 分間洗

浄した。プローブとハイブリダイズするクローンの検出は、コダック社のX線フィルム(X-OMAT<sup>TM</sup>AR)と増感スクリーンを用い、-80℃で4日間の露光によって行った。X線フィルムを現像した後、フィルムとプレートの位置を対応させながらハイブリダイズしている部分のファージを回収した。さらに上記の方法によって再プレーティングとハイブリダイゼーションを繰り返して行い、ファージのクローン化を行った。

クローン化したファージをプレートライセート法によって大量に調製し、ファージDNAを抽出した後、ベクターのクローニングサイトの両端に存在する制限酵素SalIおよびBamHI切断部位で切断してウシゲノムDNA由来の挿入断片の検出を1.2%アガロースゲル電気泳動によって行った〔図28〕。その結果、BamHI消化では3本の断片がファージ由来のバンドの他に検出された。また、SalI消化ではファージ由来のバンドに重なって1本のバンドが検出された。SalI消化断片が全長を保持していると考え、この断片をプラスミドベクターにサブクローニングするために、SalI消化後にBAP(大腸菌由来のアルカリフォスフォターゼ)処理したプラスミドベクターpUC18(ファルマシア社)とライゲーション反応を行い、大腸菌JM109に導入した。この菌からゲノム由来のSalI断片が挿入されたプラスミドDNAを大量に調製し、パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ社の370A蛍光式シーケンサーおよび同社のキットを用いてコード領域付近の塩基配列の解析を行った。その結果、〔図29〕に示すような配列が得られた。cDNAのコード領域と比較すると、ゲノムDNA由来であるために472bpのイントロンによってコード領域が2つに分割されている〔図30〕。〔図31〕および配列番号:44には、このウシのゲノムのコード領域(イントロン部分を除いたもの)から推定されるアミノ酸配列を示す。

【0096】

【実施例27】ラット延髄背側部poly(A)<sup>+</sup>RNA画分の調製およびcDNAの合成

ラットの延髄背側部よりIsogen(ニッポンジーン社)によりtotal RNAを調製後、FastTrack(Invitrogen社)を用いてpoly(A)<sup>+</sup>RNA画分を調製した。次にこのpoly(A)<sup>+</sup>RNA 5μgにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー(

BRL社)を加え、モロニーマウス白血病の逆転写酵素(BRL社)により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行った後、12 $\mu$ lの蒸留水に溶解した。またこのpoly(A)<sup>+</sup>RNA 1 $\mu$ gから、Marathon cDNA amplification kit (Clontech)により、マニュアルに従ってcDNAを合成し、10 $\mu$ lに溶解した。

【0097】

【実施例28】RACE法によるラット型生理活性ポリペプチドのcDNAの取得

ラット型生理活性ポリペプチドcDNAの全コード領域を取得するため、ウシ型を取得した方法に準じて実験を行った。まず実施例18で使用したプライマーP5-1(配列番号:35)、P3-1(配列番号:36)をプライマーとし、鋳型には実施例27でプライマーとしてランダムDNAヘキサマー(BRL社)を加え、モロニーマウス白血病の逆転写酵素(BRL社)により合成した相補DNAを鋳型としてPCRを行った。反応液は鋳型cDNAを1.25 $\mu$ l、dNTP 200 $\mu$ M、プライマーを各1 $\mu$ M、DNA polymeraseとしてExTaq(宝酒造)を用い、添付のバッファー2.5 $\mu$ lを加えて、さらに水で全量を25 $\mu$ lとした。反応は94℃・1分後、98℃・10秒、50℃・30秒、72℃・5秒のサイクルを40回繰り返した後、72℃で20秒放置した。サーマルサイクラーはGeneAmp2400(パーキンエルマー社)を用いた。増幅産物を4%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約80bpのバンドを切り出し、実施例19に示した方法でDNAを回収、プラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIへサブクローニング、大腸菌JM109へ導入し挿入されたcDNA断片の配列を解析した。その結果ラット型生理活性ポリペプチドの部分配列を得ることができた。この配列を基に3' RACE用にRA(配列番号:75)、5' RACE用にRC(配列番号:76)の2本のプライマーを合成し、5'および3' RACEを行った。

RA: 5'-CARCAYTCCATGGAGACAAGAACCCC-3'

(ここでRはAまたはG、YはTまたはCを示す。)(配列番号:75)

RC: 5'-TACCAGGCAGGATTGATACAGGGG-3'



(配列番号：76)

鋳型は実施例27でMarathon cDNA amplification kit (Clontech) により合成したものを添付のトリシン-EDTAバッファーで40倍に希釈したものの2.5  $\mu$ lを使用した。プライマーには3' RACEにはRAとキット付属のアダプタープライマーAP1を、また5' RACEにはRCとAP1をそれぞれ用いたほかは上記と同様に反応液を調製した。反応条件は94℃・1分後、98℃・10秒、72℃・45秒のサイクルを5回、98℃・10秒、70℃・45秒のサイクルを3回、98℃・10秒、68℃・45秒のサイクルを40回繰り返した。その結果3' RACEからは約400bp、5' RACEからは約400bpと250bpのバンドが得られた。これらを上記と同様の方法で回収し、これらを鋳型として反応に用いたプライマーでDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) により反応し配列を解析した。その結果5' ノンコーディング領域と推定される部分からpolyAまでの配列を得ることができた。

【0098】

【実施例29】PCRによるラット型生理活性ポリペプチドの全長cDNAの取得

実施例28で得られた配列を基に開始コドンを含む領域にrF (配列番号：77)、また終止コドンより3'側にrR (配列番号：78)の2本のプライマーを合成し全長cDNAを含む断片を増幅することとした。

rF : 5'-GGCATCATCCAGGAAGACGGAGCAT-3'

(配列番号：77)

rR : 5'-AGCAGAGGAGAGGGAGGGTAGAGGA-3'

(配列番号：78)

実施例27でモロニーマウス白血病の逆転写酵素を用いて調製したcDNAを鋳型とし、ExTaq (宝酒造)を用いて、95℃・30秒、68℃・60秒のサイクルを40回繰り返してPCRを行った。増幅産物をアガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約350bpのバンドを切り出し、実施例19に示した方法でDNAを回収、プラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIへサブクローニング、大腸菌JM109へ導入した。生じた形質転換体からプラスミドを抽出し、塩基配列

を決定した結果、ラット型生理活性ポリペプチドの全長cDNAを保有するE. coli JM109/pRAV3を得た〔図32〕。

【0099】

【実施例30】 ヒト Brain poly(A)<sup>+</sup>RNA画分からのcDNAの合成

ヒト Brain poly(A)<sup>+</sup>RNA画分 (Clontech) 1  $\mu$ gから、Marathon cDNA amplification kit (Clontech) により、マニュアルに従ってcDNAを合成し、10  $\mu$ lに溶解した。また同poly(A)<sup>+</sup>RNA画分5  $\mu$ gにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー (BRL社) を加え、モロニーマウス白血病の逆転写酵素 (BRL社) により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行った後、30  $\mu$ lのTEに溶解した。

【0100】

【実施例31】 RACE法によるヒト型生理活性ポリペプチドのcDNAの取得

実施例28で明らかになったラット型生理活性ポリペプチドのアミノ酸配列から〔図33〕に示したように特にラット型とウシ型で保存性の高かった領域を選び以下のR1 (配列番号: 79)、R3 (配列番号: 80)、R4 (配列番号: 81) の3本のプライマーを合成し、ヒトのcDNAを鋳型としてPCRをすることによりこれらに挟まれた領域の増幅を試みた。ここで、図33においてbovine.aaはウシ型ポリペプチドのアミノ酸配列、bovine.seqはウシ型ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列、rat.seqはラット型ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

R1: 5' -ACGTGGCTTCTGTGCTTGCTGCTGC-3'

(配列番号: 79)

R3: 5' -GCCTGATCCCGCGGCCCGTGTTACCA-3'

(配列番号: 80)

R4: 5' -TTGCCCTTCTCCTGCCGAAGCGGCC-3'

(配列番号: 81)

実施例30でMarathon cDNA amplification kit (Clontech) により調製したcDNAをトリシン-EDTAバッファーで30倍に希釈したもの2.5  $\mu$ lを鋳型として使用した。反応液はdNTP 200  $\mu$ M, プライマーをR1とR

4 を各  $0.2 \mu\text{M}$ , Taq Start Antibody (Clontech) と等量混合した DNA polymerase ExTaq (宝酒造) を用い、添付のバッファー  $2.5 \mu\text{l}$  を加えて、さらに水で全量を  $25 \mu\text{l}$  とした。反応は  $94^\circ\text{C} \cdot 1$  分後、 $98^\circ\text{C} \cdot 10$  秒、 $68^\circ\text{C} \cdot 40$  秒のサイクルを 42 回繰り返した後、 $72^\circ\text{C}$  で 1 分間放置した。さらにこの反応液をトリシン-EDTA バッファーで 100 倍に希釈したもの  $1 \mu\text{l}$  を鋳型として、プライマーの組み合わせを R1 と R3 に変えた以外は上記と同様の反応液を調製して  $94^\circ\text{C} \cdot 1$  分後、 $98^\circ\text{C} \cdot 10$  秒、 $68^\circ\text{C} \cdot 40$  秒のサイクルを 25 回繰り返した。増幅産物を 4% アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色したところ、期待される約 130 bp のバンドが得られたため、これを実施例 28 と同様の方法で回収し、その回収した断片を鋳型として、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) を用いて反応し配列を解析した結果、ヒト型生理活性ポリペプチドの部分配列を得ることができた。そこでこの配列を基に 3' RACE 用にプライマー HA (配列番号: 82), HB (配列番号: 83) を、5' RACE 用にプライマー HE (配列番号: 84), HF (配列番号: 85) を合成し、5' および 3' RACE を行った。

【0101】

HA:  $5' - \text{GGCGGGGGCTGCAAGTCGTACCCATCG} - 3'$

(配列番号: 82)

HB:  $5' - \text{CGGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCT} - 3'$

(配列番号: 83)

HE:  $5' - \text{CAGGCAGGATTGATGTCAGGGGTGCGG} - 3'$

(配列番号: 84)

HF:  $5' - \text{CATGGAGTGCCGATGGGTACGACTTGC} - 3'$

(配列番号: 85)

鋳型は実施例 30 で調製したものをトリシン-EDTA バッファーで 20 倍に希釈したもの  $2.5 \mu\text{l}$  を使用した。1 回目の PCR は 3' RACE には HA とアダプタープライマー AP1 を、5' RACE には HE と AP1 を用いこれまでと同様に反応液を調製した。反応条件は  $94^\circ\text{C} \cdot 1$  分後、 $98^\circ\text{C} \cdot 10$  秒、 $72^\circ\text{C} \cdot 35$  秒のサイクルを 5 回、 $98^\circ\text{C} \cdot 10$  秒、 $70^\circ\text{C} \cdot 35$  秒のサイクルを 5

回、98℃・10秒、68℃・35秒のサイクルを40回繰り返した。さらにこの反応液をトリシン-EDTAバッファーで100倍に希釈したもの1μlを鋳型として、1回目の反応サイクルと同じサイクルで2回目のPCRを行った。ただし3' RACEはプライマーをHBとAP1に、5' RACEはHFとAP2に変え、またDNA polymeraseとしてKlen Taq(Clontech)を使用し、添付のバッファーで反応液を調製した。その結果、3' RACEでは約250bpのバンドまた5' RACEでは約150bpのバンドが得られ、これらを上記と同様の方法で配列を読み、先に得られた部分配列と併せてヒト型生理活性ポリペプチドの、5'ノンコーディング領域と推定される部分からpolyAまでの配列を得ることができた。

【0102】

【実施例32】PCR法によるヒト型生理活性ポリペプチドの全長cDNAの取得

実施例31で得られた配列を基に5H（配列番号：86）と3HN（配列番号：87）の2本のプライマーを合成し全長cDNAを含む断片を増幅することとした。

5H：5'-GGCCTCCTCGGAGGAGCCAAGGGATGA-3'  
(配列番号：86)

3HN：5'-GGGAAAGGAGCCCGAAGGAGAGGAGAG-3'  
(配列番号：87)

実施例30でモロニーマウス白血病の逆転写酵素（BRL社）を用いて調製したcDNA2.5μlを鋳型とし、Klen Taq DNA polymerase (Clontech)を用いた反応液で、94℃・1分後、98℃・10秒、68℃・30秒のサイクルを40回繰り返した。得られた約360bpの断片を実施例29と同様の方法で、回収、サブクローニング（ただし、ベクターはpCR<sup>TM</sup>2.1を用いた。）、プラスミド回収し、塩基配列を決定した結果、ヒト型生理活性ポリペプチドの全長cDNAを保有するE. coli JM109/pHOV7を得た〔図34〕。またこのヒト型生理活性ポリペプチドと実施例20に示したウシ型、および実施例29に示したラット型の翻訳領域についてアミノ酸配列を比較した〔図35〕。

【0103】

【実施例33】

(1) UHR-1 発現CHO細胞の作製

最近、Susan K. Welchらによってラット視交叉上核よりオーファンレセプターであるUHR-1がクローニングされている (Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.209, No.2, pp.606-613, 1995)。

本発明者らは、この報告をもとにUHR-1遺伝子によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列とhGR3によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列の比較を行った。

その結果、両者は359アミノ酸にわたり91.6%のアイデンティティーを有することから、UHR-1はphGR3のホモログであることが推定された。UHR-1によりコードされる蛋白が19P2-L31のレセプターとして機能することを確認するために以下に述べるように、本発明者らはUHR-1 cDNAをクローニングし、それをCHO細胞に導入して安定的な発現細胞株を作製した。

ラットの下垂体前葉からFast Track<sup>TM</sup> kit (Invitrogen社) を用いて抽出した poly(A)<sup>+</sup>RNAを調製した。次に、得られた poly(A)<sup>+</sup>RNA 0.2 μgを鋳型とし、TaKaRa RNA PCR kit (宝酒造) を用いて全量40 μlの反応スケールでcDNAを合成した。反応産物は、フェノール：クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱を行った後、10 μlの蒸留水に溶解した。既知のラット・UHR-1 cDNAの塩基配列(GenBank, Accession Number S77867)をもとに、以下に示す2種の合成DNAプライマーを作成した。

(1) 5'-GTTACACAG (GTCGAC) ATGACCTCAC-3'

(括弧内はSal I 認識配列を示す) (配列番号: 95)

(2) 5'-CTCAGA (GCTAGC) AGAGTGTCATCAG-3'

(括弧内はNhe I 認識配列を示す) (配列番号: 96)

上記のプライマー(1)と(2)を一組として用いて、上述の方法で合成したcDNAを鋳型としてPCRを行った。反応には、調製したcDNA溶液を5倍

に希釈したものを $5\mu\text{l}$ 、Ex Taq（宝酒造）とTaq Start Antibody（クロンテック）を1:1で混合したものを $1\mu\text{l}$ 、Ex Taqに添付の $10\times$ 反応バッファーを $5\mu\text{l}$ およびdNTPを $4\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{M}$ の濃度に調製したプライマーを各 $1\mu\text{l}$ 使用し、蒸留水にて液量を $50\mu\text{l}$ に調製した。

#### 【0104】

PCRは、 $95^{\circ}\text{C}$ ・2分ののち、 $95^{\circ}\text{C}$ ・30秒、 $65^{\circ}\text{C}$ ・30秒、 $72^{\circ}\text{C}$ ・1分の3ステップを1サイクルとして27回繰り返して行い、その後に $72^{\circ}\text{C}$ ・7分の伸長反応を加えた。反応終了後に、反応液の一部を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色し約 $1.1\text{ kbp}$ のバンドを切り出し、遠心濾過チューブ（ミリポア社）で遠心濾過し、フェノール抽出次いでエタノール沈澱を行ってDNAを回収した。回収したDNAをTAクローニングキット（Invitrogen社）のマニュアルに従い、プラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIヘサブクローニングし（以下、pCRII-UHR-1と称する）、大腸菌JM109に導入し、得られた形質転換体をアンピシリンを含むLB培地で培養後、自動プラスミド抽出器（クラボウ社）でプラスミドを得た。

このプラスミドをABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing kit, FS（パーキンエルマー社）を用い、マニュアルに従い反応させ、塩基配列を蛍光自動DNAシーケンサー（ABI社）により解読した。

塩基配列の解析の結果、PCRによって入手したcDNA断片は $1116\text{ bp}$ から成ることが確認された〔図52〕。〔図52〕は、発現ベクターpAKKO-UHR-1上で構築されたラット・UHR-1の完全なコード領域の塩基配列と、それにコードされるアミノ酸配列を示す。図中、アンダーラインを付したprimer(1),(2)は、それぞれのプライマー配列の一部に相当する部分を示す。また、二重線は公知の塩基配列と異なる部分を示す（664番目のC、865番目のG、897番目のG）。ここで、公知の塩基配列はデータバンクGenBank Accession No. S77867を引用したものである。

#### 【0105】

これらの塩基置換のうち、一つは $^{289}\text{Leu}(\text{CTC}) \rightarrow ^{289}\text{Val}(\text{GTC})$ のアミノ酸置換を伴うものであった。UHR-1発現ベクターの構築は以下の様

にして行った。

pCRII-UHR-1を制限酵素Nhe I（宝酒造）およびSal I（宝酒造）で切断した。切断したサンプルをアガロースゲル電気泳動した後エチジウムブロマイド染色し、そのバンド部分をカミソリで切り出した。このゲル断片をフィルター付き遠心チューブ（ミリポア）に入れ、冷凍庫内で凍結、その後に室温にて融解させた後、チューブを8000回転で1分間遠心して、フィルターの下部にDNA断片を含む溶液を溶出させた。この溶液を、定法に従ってフェノール抽出、フェノール・クロロホルム（1：1）抽出、ジエチルエーテル抽出して不純物を除去した後、エタノール沈澱によってDNAを沈澱させcDNA断片を得た。

pAKKO-111Hを制限酵素Nhe I（宝酒造）およびSal I（宝酒造）で切断した後、上述と同様の方法によりベクター部分をアガロースゲルから分離、抽出した。こうして得られたcDNA断片とpAKKO-111Hの制限酵素消化物をライゲーション・システム（宝酒造）を用い、16℃で30分反応させた。ライゲーション反応産物の一部を用いて、大腸菌JM109を形質転換させ、形質転換体*Escherichia coli* JM109/pAKKO-UHR-1を得た。得られた形質転換体*Escherichia coli* JM109/pAKKO-UHR-1をアンピシリン（50 µg/ml）を含むLB培地2ml中で一晚培養し、プラスミド自動抽出装置（クラボウ社）によってプラスミドDNA（pAKKO-UHR-1）を調製した。蛍光式シーケンサーを用いて、cDNA断片とpAKKO-111Hの連結部位の塩基配列を解析し、発現ベクターpAKKO-UHR-1の構築が完了したことを確認した。

#### 【0106】

##### （2）CHO dhfr<sup>-</sup>細胞へのUHR-1発現ベクターの導入

直径10cmの組織培養用シャーレに $1 \times 10^6$ 個のCHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種し、24時間培養した。（1）で得られたUHR-1発現ベクターpAKKO-UHR-1を20 µg用い、リポソーム法による遺伝子導入キット（ジーントランスファー、ニッポンジーン社）を用いて、DNA・リポソームの複合体を形成させた。培地を新鮮なものに交換し、これにDNA・リポソームの複合体を添加

して一晩インキュベートした。培地を新鮮なものと交換してさらに1日間培養した後、形質転換体選択用の培地に交換して2日間培養した。さらに、トリプシン-EDTA処理によってシャーレ内の細胞を回収し、細胞密度が希薄な状態にて再培養を行うことによって、形質転換体の割合の増加を図った。これにより、UHR-1を安定に高発現する細胞株CHO-UHR-1のクローンを得た。

## 【0107】

【実施例34】19P2-L31の $^{125}\text{I}$ による標識および標識体を用いたレセプター結合実験

19P2-L31のヨードラベル化は $[\text{}^{125}\text{I}]$ -Bolton-Hunter Reagent (NEN/DuPont; NEX-120)を用いて行った。まず、 $[\text{}^{125}\text{I}]$ -Bolton-Hunter Reagent (2200 Ci/mmol) 200  $\mu\text{l}$ を500  $\mu\text{l}$ エッペンドルフチューブに移し、窒素ガスにて完全に乾燥させた。アセトニトリル2  $\mu\text{l}$ にて再溶解し、さらに50 mMリン酸バッファー pH 8.0 4  $\mu\text{l}$ 、合成19P2-L31  $3 \times 10^{-4}\text{M}$  4  $\mu\text{l}$ を加え、混和し、室温にて40分間反応させた。反応後、1.0 Mグリシン 5  $\mu\text{l}$ を加えて反応を停止し、反応液全量を逆相カラム (TOSO; TSKgel ODS-80T MCTP) にかけて、 $[\text{}^{125}\text{I}]$ 標識19P2-L31 ( $[\text{}^{125}\text{I}]$ -19P2-L31)を分離した。 $[\text{}^{125}\text{I}]$ -19P2-L31を含む画分は、2倍量の50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.1% BSA、0.05% CHAPSにて希釈し、少量ずつ分注の後、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

## 【0108】

レセプター結合実験ではレセプター発現CHO細胞としてCHO-19P2-9、CHO-UHR-1およびmock CHOを用いた。CHO-19P2-9細胞はCHO-19P2細胞を96穴マイクロプレートを用いた限界希釈法により、19P2-L31によるアラキドン酸代謝物の遊離促進反応がより強いクローンとして選択したものである。mock CHO細胞は、発現ベクターpAKKO単独でトランスフォームしたコントロール細胞である。組織培養用フラスコで培養したこれらの細胞を5 mM EDTA/PBSにて剥離し、0.05% BSA、0.05% CHAPSを含むHBSSに $0.5 \times 10^7$  cells/mlとなるよう再懸濁した。この細胞浮遊液100  $\mu\text{l}$ に、 $[\text{}^{125}\text{I}]$ -19P2-L31を200



pMとなるように、さらに一部の細胞浮遊液にはNSB (non specific binding; 非特異的結合) として19P2-L31を200nMとなるように追加し、室温にて2.5時間反応させた。反応後、ガラスフィルターGF/F (Wattman) を用いて、B/F分離を行い、フィルターにトラップされたカウントをレセプター結合量としてγ-カウンターにて測定した。

〔図36〕には、生細胞における $[^{125}\text{I}]$ -19P2-L31を用いたレセプター結合実験の結果を示す。

細胞浮遊液 $0.5 \times 10^7$  cells/ml 100  $\mu$ lに $[^{125}\text{I}]$ -19P2-L31を200pMとなるように加え、室温2.5時間の反応でレセプターに結合した $[^{125}\text{I}]$ -19P2-L31の量および非特異的結合量をγ-カウンターで測定した。実験はtriplicateで行い、その平均値および標準偏差を示した。

hGR3とUHR-1を発現させたCHO細胞において、 $[^{125}\text{I}]$ -19P2-L31の特異的結合が観察された。これらの結果はhGR3およびUHR-1によってコードされる蛋白質が19P2-L31の特異的なレセプターとして機能していることを示している。

#### 【0109】

【実施例35】19P2-L31によるCHO-19P2-9およびCHO-UHR1からの特異的なアラキドン酸代謝物の遊離促進

実施例11と同様の方法でCHO-19P2-9、CHO-UHR1およびmock CHOにおける19P2-L31によるアラキドン酸代謝物遊離活性を測定した。

〔図37〕にはCHO-19P2-9およびCHO-UHR1における19P2-L31によるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定結果を示す。実験はduplicateで行い、その平均値を示した。

UHR1を発現させたCHO細胞でも、CHO-19P2-9と同様の19P2-L31によるアラキドン酸代謝物遊離の活性が確認された。これらの結果はUHR-1によってコードされる蛋白質がhGR3と同様に19P2-L31の特異的なレセプターとして機能していることを示している。

【0110】

【実施例36】RT-PCRによるラット組織のリガンドポリペプチドおよびラット型G蛋白質共役型レセプター(UHR-1)の発現定量

(1) ラットの組織からの poly(A)<sup>+</sup>RNA調製

8週齢のラット(♂)より各種組織の poly(A)<sup>+</sup>RNAを、Isogen (Nippon gene) による total RNA調製に引き続き、オリゴdTセルロースカラム (Pharmacia) を用いて約5~30 μg調製した。

poly(A)<sup>+</sup>RNA画分中の genome DNAを完全に除くため、DNase I (Gibco BRL, amplification grade) を1ユニット用いて室温でDNAを分解した。25mM EDTAを加え、65℃で10分処理し、DNase Iを不活性化した。水で40 ng/μlに希釈し、その160 ngから10ユニットAMV reverse transcriptase XL (Takara), 2.5 μM random 9mer (Takara、終濃度2.5 μM), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.4 mMの各dNTPを用いてcDNAを合成した。合成反応は30℃・10分の後、42℃・30分、99℃・5分、5℃・5分とした。反応産物をエタノール沈殿しトリシン-EDTAバッファーで40 μlに溶解した(4 ng poly(A)<sup>+</sup>RNA/μl)。

【0111】

(2) ポジティブコントロール用プラスミドベクターの調製

ラットのグリセロールアルデヒド-3-リン酸-脱水素酵素(G3PDH, GenBank accession number M17701)は、Fast Track (Invitrogen) で調製したラット下垂体由来細胞株GH3の poly(A)<sup>+</sup>RNAから、上記(1)と同様の方法で合成したcDNAを鋳型として、Clontech社のG3PDH増幅用プライマーセットを用いてPCR法で増幅させた。UHR-1はやはりGH3のcDNAを鋳型として、

rRECF: 5'-CCTGCTGGCCATTCTCCTGTCTTAC-3'

(配列番号: 88)

と、

rRECR: 5'-GGGTCCAGGTCCCGCAGAAGGTTGA-3'

(配列番号: 89)

を用いて増幅し、TAクローニングキット(Invitrogen)のpCR<sup>TM</sup>2.1ベクターへサブクローニングして得た。これら大腸菌JM109に導入して形質転換体を得た。またリガンドペプチドはJM109/pRAV3として寄託したものを用いた。これらの形質転換体はアンピシリンを含むLB培地で培養後、Qia-gen Plasmid Midi kit (QIAGEN)でプラスミドを精製し、吸光度により濃度を定量してポジティブコントロール用プラスミドベクターとした。

### 【0112】

#### (3) RT-PCR

上記(1)および(2)で調製したcDNA溶液およびポジティブコントロール用プラスミドベクターをそのままあるいは適当な濃度に水で希釈して鋳型とした。G3PDH, UHR-1およびリガンドペプチド増幅用プライマーは、それぞれClontech社のG3PDH増幅用プライマーセット、rRECFとrRECR

r19F: 5'-GAAGACGGAGCATGGCCCTGAAGAC-3'

(配列番号: 90)

と、

r19R: 5'-GGCAGCTGAGTTGGCCAAGTCCAGT-3'

(配列番号: 91)

を終濃度200nMで使用した。反応液は希釈した鋳型4μl、各200nMプライマー、dNTP(終濃度各100μM)、DNA polymeraseとしてKlenTaq(Clontech)を用い、KlenTaq添付のバッファーと水で25μlとした。反応はG3PDHは94℃・1分の後、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを26回、UHR-1とリガンドペプチドは94℃・1分の後、98℃・10秒、68℃・25秒のサイクルを34回繰り返した。増幅産物をあらかじめエチジウムブロマイド染色した1.2%あるいは4%のアガロースゲルを用いて電気泳動し、得られた泳動図をCCDカメラ(FOTODYNE, Foto/Eclipse)で取り込み、解析ソフト(Advanced American Biotechnology)でバンドの濃さを数値化、定量した。定量値はG3PDHは4ng poly(A)<sup>+</sup>RNAあたりの

pgで、またUHR-1とリガンドペプチドは4 ng poly(A)<sup>+</sup>RNAあたりのpgおよびその値をG3PDHのpgで割った値として算出した〔図38、39〕。

その結果、UHR-1とリガンドペプチドは調べた組織全てで発現が確認された。UHR-1は下垂体で発現量が多く、脳全体にも広く分布していたが、末梢の組織では副腎を除いて発現はあまり高くなかった。一方、リガンドペプチドは、脳では延髄、視床下部で発現が高く、下垂体での発現は低かった。末梢組織においても肺、胸腺、脾臓、腎臓、副腎、精巣などで比較的高い発現が認められた。これらの結果はUHR-1とそのリガンドペプチドが様々な組織においてその機能調節に重要な役割を果たしていることを示している。

#### 【0113】

【実施例37】 19P2-L31のグルコースによる血漿インスリン濃度の増加に及ぼす影響

ペントバルビタール（65 mg/kg、腹腔内投与）で麻酔したWistarラット（8-10週齢 ♂）に総頸静脈から一過性にグルコース（86 mg/ラット）を単独で、あるいは同グルコースと19P2-L31（ラットあたり各675 pmol、2.25 nmol、6.75 nmol、67.5 nmol）を同時投与し、投与した反対側の総頸静脈から経時的に採血し血漿中のインスリン濃度をラジオイムノアッセイで測定した。測定にはアマシャム社のインスリンアッセイキットを使用した。

19P2-L31は投与量675 pmol、2.25 nmol、6.75 nmolでは、グルコースによる投与2分後の急激な第一相目のインスリン濃度の増加、および投与後6分以降に見られる緩徐な第二相目の血漿インスリン濃度の増加を部分的に抑制した。67.5 nmolの19P2-L31は第一相と第二相両方のインスリン濃度の増加を完全に抑制した〔図40〕。

#### 【0114】

【実施例38】 マウスの行動量に及ぼすリガンドポリペプチドの影響

本発明者らは、19P2-L31、19P2-L20のマウス側脳室内投与が行動量に及ぼす影響を検討した。成熟ICR系雄性マウス（手術時体重：約35 g）をペントバルビタール50 mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を露出し、一側脳室にガイドカニューレを埋め込むために歯

科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。側脳室内薬液注入用のステンレス製ガイドカニューレ（24 G、長さ5 mm）の先端をAP：+0.6 mm（ブレグマより）、L：左1 mm、H：-1 mm（硬膜より）の位置に挿入した。ガイドカニューレは頭蓋骨に接着剤で固定した。術後、マウスは3日以上飼育して術後の回復を待ってから行動解析実験を行った。

マウスの自発運動量の測定には、防音箱内の24×37×30 cmの透明アクリル製の自発運動測定用ケージを用いた。マウスを該ケージに一匹ずつ入れ、12時間毎の明暗条件（明：6-18時）で、また、水と餌は自由に摂取できる条件下で自発運動量と立ち上がり行動量をそれぞれ測定した。行動量の測定には、Supermex（室町機械）を用いた。薬物あるいはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）は午後2：30±30分に投与した。投与時には、ステンレス製マイクロインジェクションカニューレ（30 G、長さ6 mm）をガイドカニューレに挿入した。マイクロインジェクションカニューレは、テフロンチューブを用いてマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSあるいはペプチドを溶解したPBSを流速2  $\mu$ l/分で2分間注入した。注入後は、2分間以上待ってからマイクロインジェクションカニューレを外し、行動量を測定した。

#### 【0115】

結果は、平均値±S. E. M. で表し、これらペプチド処置とPBS処置とが体温に及ぼす影響に有意差があるか否かの検定は Student's t-testによって行った。判定は、両側検定で危険率（p）が5%以下を統計的に有意であるとした。〔図41〕に示すごとく、19P2-L31を10 nmol投与した場合、マウスの自発運動量は投与後70分後から105分後まで、有意に増加した。立ち上がり行動も同様に有意な変化を示した。19P2-L31を1 nmol投与した場合、自発運動量には変化が認められず、立ち上がり行動量が投与105分後で有意な低下を示したのみであった〔図42〕。19P2-L31を0.1 nmol投与した場合、自発運動量は、投与後25分および40分、70分において有意な増加を示した。立ち上がり行動量にも同様の増加傾向は認められたが有意ではなかった〔図43〕。また、19P2-L31を0.01 nmol投与した場合、自発運動量は、投与後20分および40分で有意に増加した。立ち上がり行動も同じように

増加傾向を示したが有意な変化は認められなかった〔図44〕。

【0116】

【実施例39】マウスのレセルピン誘発低体温に及ぼすリガンドポリペプチドの影響

成熟ICR系雄性マウス（手術時体重：約35g）をペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を露出し、一側脳室にガイドカニューレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。側脳室内薬液注入用のステンレス製ガイドカニューレ（24G、長さ5mm）の先端をAP：+0.6mm（ブレグマより）、L：左1mm、H：-1mm（硬膜より）の位置に挿入した。ガイドカニューレは頭蓋骨に接着剤で固定した。術後、マウスは3日以上飼育して術後の回復を待ってから体温測定を行った。レセルピン（アポプロン注1mg、第一製薬）3mg/kgを皮下注射し、その15時間後にマウスを個別の測定用ケージに移した。ステンレス製マイクロインジェクションカニューレ（30G、長さ6mm）をガイドカニューレに挿入した。マイクロインジェクションカニューレは、テフロンチューブを用いてマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSあるいはペプチドを溶解したPBSを流速2 $\mu$ l/分で2分間注入した。注入後は、2分間以上待ってからマイクロインジェクションカニューレを外し、直腸温を測定した。

結果は、平均値 $\pm$ S.E.M.で表し、これらペプチド処置とPBS処置とが体温に及ぼす影響に有意差があるか否かの検定はStudent's t-testによって行った。判定は、両側検定で危険率（p）が5%以下を統計的に有意であるとした。〔図45〕に示すように、19P2-L31を10nmol投与した場合、レセルピンによって低下していた体温はPBSを投与した対照群に比し有意に上昇した。この体温の上昇は、19P2-L31投与後45分でピークに達した。一方、1nmolの19P2-L20投与群と対照群との間には差が認められなかった。

【0117】

【実施例40】リガンドポリペプチドがラットの血圧に及ぼす影響

本発明者らは、19P2-L31の延髄最後野への注入が血圧に及ぼす影響を検討した。成熟Wistar系雄性ラット（手術時体重：約300g）をペントバルビ

タール 50 mg/kg の腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切歯用バーはインターオーラルラインから 3.3 mm 低くした。頭蓋骨を露出し、ガイドカニユーレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、その周囲の 2ヶ所にアンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニユーレ、AG-12（内径 0.4 mm、外径 0.5 mm、エイコム社）を、その先端が最後野の上部に位置するように挿入した。そのために、ガイドカニユーレは垂直方向から 20 度の角度をつけて前方より挿入した（〔図 4 6〕、但し図中にはガイドカニユーレより 1.0 mm 長いマイクロインジェクションカニユーレを示す）。定位座標は、Paxinos と Watson (1986) のアトラスを参考にして AP: -0.6 mm（インターオーラルラインより）、L: 0.0 mm、H: +1.5 mm（インターオーラルラインより）とした。ガイドカニユーレは瞬間接着剤と歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に固定した。ガイドカニユーレにはステンレス製ダミーカニユーレ、AD-12（外径 0.35 mm、エイコム社）を挿入し、キャップナット（エイコム社）で固定した。その後、ラットは個別のケージで飼育した。

【0118】

ガイドカニユーレを埋め込んでから約 1 週間飼育して術後の回復を待ち、無麻酔血圧測定用の手術を行った。ラットをペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与にて麻酔し、解剖用パッドの上に背位に固定して左側の大腿動脈を露出させた。ポリエチレンチューブ SP35（内径 0.5 mm、外径 0.9 mm、夏目製作所）を約 60 cm の長さに切り、200 単位/ml ヘパリン含有生理食塩水で満たした後、大腿動脈に約 2.5 cm 挿入し固定した。チューブのもう一端は背側の皮下を通して頸部（背側）より露出させた。

術後一晩待ってからポリエチレンチューブをトランスデューサー（Spectramed）に接続し、血圧を測定した。安定した血圧が測定可能になった後、ラットの頭蓋骨に装着したキャップナットとダミーカニユーレを取り外し、代わりにテフロンチューブ（長さ 50 cm、内径 0.1 mm、外径 0.4 mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニユーレ、AMI13（内径 0.17 mm、外径 0.35 mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニユーレの長さは、その先端 1 mm がガイドカニユーレから露出するように調節しておいた

【図46】。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSまたは19P2-L31を溶解させたPBSを1.0  $\mu$ l/分の流速で計2  $\mu$ lを最後野に注入した。

血圧測定後、19P-L31を注入したマイクロインジェクションカニユーレを外し、色素（エバンスブルー）注入用マイクロインジェクションカニユーレに替えた。色素は、19P-L31と同様に流速1.0  $\mu$ l/分で2分間注入した後約3分間待ってからマイクロインジェクションカニユーレを外した。ラットを断頭し、速やかに脳を摘出し、凍結した。クリオスタットを用いて凍結切片を作製し、色素の注入位置を確認した。

上記実験の結果、延髄最後野に19P2-L31を10nmol注入すると血圧の上昇が認められた。脈波および平均血圧の典型例を【図47】に示す。

#### 【0119】

【実施例41】リガンドポリペプチドが血漿中下垂体ホルモン量に及ぼす影響

本発明者らは、19P2-L31の第三脳室内投与が血漿中の下垂体ホルモン量に及ぼす影響を検討した。成熟Wistar系雄性ラット（手術時体重：約290～350g）をペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切歯用バーはインターオーラルラインから3.3mm低くした。頭蓋骨を露出し、ガイドカニユーレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、その周囲の一ヶ所にアンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニユーレ、AG-12（内径0.4mm、外径0.5mm、エイコム社）を、その先端が第三脳室の上部に位置するように挿入した。定位座標は、PaxinosとWatson（1986）のアトラスに従い、AP：+7.2mm（インターオーラルラインより）、L：0.0mm、H：+2.0mm（インターオーラルラインより）とした。ガイドカニユーレは瞬間接着剤と歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に固定した。ガイドカニユーレにはステンレス製ダミーカニユーレ、AD-12（外径0.35mm、エイコム社）を挿入し、キャップナット（エイコム社）で固定した。術後、ラットを個別のケージで3日以上飼育し、術後の回復を待ってから、実験を行った。



## 【0120】

上記手術を施したラットをペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、解剖用パッドの上に背位に固定した。両側の頸静脈を露出させた後、容量1mlのツベルクリン用注射筒と24G注射針（いずれもテルモ社）を用いて400 $\mu$ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め200単位/mlのヘパリンを含有する生理食塩水を20 $\mu$ l入れておいた。ラットの頭蓋骨に装着したキャップナットとダミーカニューレを取り外し、代わりにテフロンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.4mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニューレ、AMI13（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSまたは19P2-L31を溶解させたPBSを2.5 $\mu$ l/分の流速で計10 $\mu$ lを第三脳室に注入した。注入終了後1分間待ってからマイクロインジェクションカニューレを取り外し、再びダミーカニューレをキャップナットで固定した。脳室内投与を開始する直前、および脳室内投与の開始時点から10、20、30、40、60分後に頸静脈より400 $\mu$ lずつ採血した。採取した血液は微量高速冷却遠心機（MR-150, トミー精工）を用いて遠心（5,000rpm、10分間）し、上清（血漿）を回収した。血漿中に含まれる下垂体ホルモン（プロラクチン、黄体形成ホルモン（LH）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、成長ホルモン（GH））量をそれぞれラジオイムノアッセイを用いて測定した。

結果は、平均値 $\pm$ S. E. M. で表した。19P2-L31を溶解させたPBS投与群とPBSのみを投与した対照群との間に有意差があるか否かの検定にはStudent's t-testを用いた。判定は、両側検定で危険率5%以下を統計的に有意であるとした。〔図48〕に示すごとく、血漿中成長ホルモン量は、50nmolの19P2-L31を第三脳室に投与後20分において対照群に比し有意に減少した。投与後10、30、40分においても減少傾向は認められたが、有意ではなかった。また、投与60分後では対照群との間に差は認められなかった。また

、血漿中プロラクチン、LH、ACTH、TSH量は有意な変化を示さなかった。

# 【0121】

【実施例42】リガンドポリペプチドが自由行動下ラットにおける血漿中成長ホルモン量に及ぼす影響

成熟Wistar系雄性ラットをペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、実施例41と同様にステンレス製ガイドカニューレ、AG-12（内径0.4mm、外径0.5mm、エイコム社）を、その先端が第三脳室の上部に位置するように固定した。術後、ラットを個別のケージで3日以上飼育し、術後の回復を待ってからペントバルビタール麻酔下（50mg/kg、i.p.）でヘパリン（200単位/ml）含有生理食塩水を満たしたカニューレ（長さ30cm、内径0.5mm、外径0.9mm、夏目製作所）を右頸静脈より右心房に挿入した。ラットを一晩飼育して完全に麻酔から覚醒させた後、透明アクリル製ケージ（30×30×35cm）に移した。容量1mlのツベルクリン用注射筒と24G注射針（いずれもテルモ社）を心房に挿入したカニューレに接続し、300μlの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め200単位/mlのヘパリンを含有する生理食塩水を20μl入れておいた。第三脳室に挿入したガイドカニューレにテフロンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.4mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニューレ、AMI13（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSまたは19P2-L31を溶解させたPBSを2.5μl/分の流速で計10μlを第三脳室に注入した。第三脳室内投与開始10分後に心房に挿入したカニューレを通して生理食塩水に溶解させた成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）を5μg/kg投与した。脳室内投与を開始する直前、およびGHRH投与時点から10、20、30、40、60分後に頸静脈より300μlずつ採血した。採取した血液は遠心（5,000rpm、10分間）し、上清（血漿）を回収した。血漿中に含まれる成長ホルモン（GH）量はラジオイムノアッセイを用いて測定した。

結果は、平均値±S. E. M. で表した。19P2-L31を溶解させたPBS投与群とPBSのみを投与した対照群との間に有意差があるか否かの検定にはStudent's t-testを用いた。判定は、両側検定で危険率5%以下を統計的に有意であるとした。〔図49〕に示すごとく、5 $\mu$ g/kgのGHRH投与は血漿中GH量を増加させた。しかし、50nmolの19P2-L31を第三脳室に投与するとGHRHによる血漿中GH量の増加は有意に抑制された。

#### 【0122】

#### 【実施例43】ウサギポリクローナル抗体の作製

ウシ19P2-L31のN末端側ペプチド〔ペプチド-I、SRAHQHSMEIRTPDC（配列番号：92）〕、c末端側ペプチド〔ペプチド-II、CAWYAGRGIRPVGRFNH<sub>2</sub>（配列番号：93）〕および中央部分のペプチド〔ペプチド-III、CEIRTPDINPAWYAG（配列番号：94）〕を化学合成し、常法通りKLHと結合した。フロインドの完全アジュバント(FCA)と生理食塩水に溶解した上記ペプチド600 $\mu$ gを混合し、均一なエマルジョンにした後、それぞれ3羽ずつのウサギ(NZW、♂、2.5kg)の背部に皮下注射した。さらに3週間後追加免疫として、フロインドの不完全アジュバント(FIA)と生理食塩水に溶解した上記のペプチドとKLHのコンジュゲイトを混合し、均一なエマルジョンにした後ウサギ背部に皮下注射した。3週間間隔で計3回追加免疫を行った。

抗体価の測定は以下のように行った。最終免疫の2週間後、ウサギ耳の静脈から採血し、血液を37℃で1時間保温後、4℃で1昼夜放置したのち遠心し、抗血清を得た。抗血清を各濃度に希釈し、予め、ヤギ抗ウサギIgG(Fc)抗体を固定したポリスチレン性96穴マイクロプレートに100 $\mu$ lずつ加え、4℃で16時間インキュベートした。抗血清を除去し、洗浄後、HRP標識ペプチド-I、II、IIIを添加した。室温で4時間インキュベートし、十分にウェルを洗浄した後、反応基質を加え、呈色反応を行った。酵素反応停止溶液100 $\mu$ lを加えて反応を停止させた後、マイクロプレート用比色計を用い450nmにおける吸光度を測定した。〔図50〕に示すように免疫後の血清中に各ペプチドに対する結合活性が検出された。

抗体は以下のようにして調製した。抗血清は硫酸塩析によりIgG画分を濃縮し

、ホウ酸バッファーに溶解後、透析した。抗ペプチド-IのIgG画分をペプチド-Iセルロファインカラムに、さらに抗ペプチド-IIおよび抗ペプチド-IIIのIgG画分を19P2-L31-セファローズ4Bカラムに負荷し、ホウ酸バッファーおよび酢酸バッファー（100mM、pH4.5）で洗浄後、グリシン塩酸バッファー（200mM、pH2.0）でそれぞれ溶出した。溶出液には1Mのトリスを加えて中和した後、精製抗体として使用した。

【0123】

【実施例44】ウサギポリクローナル抗19P2-L31抗体による19P2-L31の生物活性の中和作用

実施例43の方法で調製した3種類のIgG抗体の19P2-L31に対する中和活性を実施例11記載のアラキドン酸代謝物放出活性測定系により検討した。すなわち、IgG抗体を各濃度に希釈し、19P2-L31（ $5 \times 10^{-10}$ M）と室温で1時間インキュベーション後、残存活性を19P2レセプター発現CHO細胞を使用して測定した〔図51〕。ペプチド-IIに対するポリクローナル抗体に最も強い19P2-L31に対する中和活性が認められた。

【0124】

【実施例45】マウス・ゲノムDNAからのリガンドポリペプチドコード領域を含むDNAの取得及び配列決定

実施例29で得られたラット由来のリガンドポリペプチドをコードするcDNA配列（図32）をもとに以下の2種のプライマーを合成した。

rFBG: 5'-AGATTGGCATCATCCAGGAAGACGGAGCAT-3' [配列番号: 95]

rRSA: 5'-GTCGACTCAGCAGCACTGTCTTCTCGAGCTG-3' [配列番号: 96]

この2種のプライマーを用いてマウス・ゲノムDNA（Mouse BALB/c genomic DNA）0.5ngを鋳型としてPCR法による増幅を行った。

反応液の組成は、合成DNAプライマー各200nM、鋳型DNA0.5ng、0.25mM dNTPs ExTaq polymerase 0.5μlおよび酵素に付属のバッファーで、総反応溶液は50μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキ

ンエルマー社)を用い、95℃ 30秒、67℃ 60秒を30 cycle繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエキジウムブロマイド染色によって行い、生じた約1 kbのバンドを回収後、TAクローニングキッ

ト (invitrogen社)を用いてサブクローニングした。そのライゲーションミクスチャーをE.coli. JM109にTransformationし、挿入断片をもつクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンを分離し、形質転換体Escherichia coli JM109/pmGB3を得た。このクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、自動プラスミド抽出装置を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてABI Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の情報はDNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用いて行った〔図53〕。下線で示す部分はプライマーの配列に相当する部分である。

決定した塩基配列をもとに配列番号: 2, 46または60で表わされる配列と比較した結果、Escherichia coli JM109/pmGB3の保持するプラスミドpmGB3に挿入されたDNA断片が新規のマウス型リガンドポリペプチドをコードすることが分かった〔図54〕。

#### 【0125】

【実施例46】 下垂体由来細胞株RC-4B/Cからのプロラクチン分泌に対する19P2-L31の影響

ラット下垂体由来細胞株RC-4B/C (Hurbain-Kosmath et al. In Vitro Cell. Dev. Biol. vol.26 431-440, (1990)) を $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルの濃度で12ウェルプレート(住友ベークライト)に播き、2日間培養した。培地組成は上記参考文献に従い(DMEM(ニッスイ):  $\alpha$ -MEM(Gibco) = 1:1, 10% ウシ胎児血清, 1.5g/l グルコース(Wako), 0.2mg/ml BSA(Sigma), 0.5% 非必須アミノ酸溶液(Flow Laboratories), 15mM HEPES(Wako) pH 7.3, 2.5ng/ml EGF(Genzyme), 50ng/ml Gentamicin(Gibco))、34℃ 10% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

培養した細胞をインキュベーション・バッファー(DMEM:  $\alpha$ -MEM = 1

: 1, 0.5g/l グルコース, 0.1% BSA, 0.5% 非必須アミノ酸溶液, 15mM HEPES pH7.3) で3回洗浄後、同バッファーを加え、34℃ 10%CO<sub>2</sub>で15分間プレ・インキュベートした。再び、同バッファーで2回洗浄した後、インキュベーション・バッファーで調製したウシ・19P2-L31 ペプチド（配列番号：5のペプチド）を図55に示す各濃度で添加し、34℃ 10%CO<sub>2</sub>で30分間インキュベートした。浮遊した細胞を除くため、高速微量遠心機にて遠心し、上清を-30℃で保存した。

以上の操作で得られた培養上清サンプル中に含まれるプロラクチン濃度について、ラット・プロラクチン [<sup>125</sup>I] アッセイシステム (Amersham) を用いて測定した。

〔図55〕に示したとおり、19P2-L31の添加によって、濃度依存的にRC-4B/C細胞からのプロラクチン分泌量が上昇することが示された。図において\*\*を付した点は、students' t-testで検討した結果、19P2-L31無添加の場合に比べ、危険率0.01以下で有意であることを表す。

#### 【0126】

【実施例47】ラット下垂体初代培養細胞からのプロラクチン分泌に対する19P2-L31の影響

ラット下垂体初代培養細胞の調製は塩田らの方法 (Acta Endocrinologica vol.106 71-78 (1984)) に準じた。

哺乳約11日齢のFischer344/Nメスラット (SLC社) を断頭・屠殺後、下垂体前葉を採取した。得られた下垂体片をバッファーA (137mM NaCl (Wako), 5mM KCl (Wako), 0.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Wako), 50μg/ml ゲンタマイシン (Gibco)) で洗浄後、バッファーAにて調製した酵素液I (0.4% コラゲナーゼA (ベーリンガー・マンハイム), 10μg/ml DNase (Sigma), 0.4% BSA (Sigma), 0.2% グルコース (Wako)) で37℃1時間処理した。ピペッティングで下垂体片を細胞に分散した後、遠心分離して上清を除き、同じくバッファーAで調製した酵素液II (0.25% パンクレアチン (Sigma)) に懸濁して37℃で8分間処理した。ウシ胎児血清添加によって反応を停止した後、遠心分離して上清を除いた。得られた細胞をDMEM-I (DME

M: Dulbecco's Minimum Essential Medium, 10% ウシ胎児血清, 20mM HEPES pH7.3, 50U/ml ペニシリン, 50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) に懸濁してセル・ストレーナー (Falcon) に通して混入している細胞塊・繊維等を除いた後、DMEM-I にて2回洗浄した。得られた細胞をDMEM-I で希釈し、 $1.5 \times 10^5$ /ウェルの細胞密度で播種し、37℃ 5%CO<sub>2</sub>で4日間培養した。

#### 【0127】

培養3日目に培地を新鮮なものに交換し、培養4日目に以下の通りに培養上清サンプルを調製した。細胞をDMEM-II (DMEM, 0.2% BSA, 20mM HEPES pH7.3) で3回洗浄した後、DMEM-IIを添加して37℃ 5%CO<sub>2</sub>で1時間プレ・インキュベートした。DMEM-IIで2回洗浄した後、DMEM-IIで調製した19P2-L31 ペプチド (配列番号: 5のペプチド) を図56に示す各濃度で添加し、37℃ 5%CO<sub>2</sub>で1時間反応させた。上清を回収し、遠心分離にて浮遊細胞を除去後、-30℃で保存し、上清サンプルとした。

培養上清中のプロラクチン濃度はラット・プロラクチン [<sup>125</sup>I] アッセイシステム (Amersham) を用いて測定した。

〔図56〕に示した通り、19P2-L31の添加によって、濃度依存的に下垂体初代培養細胞からのプロラクチン分泌量が上昇することが示された。図において\*\*を付した点は、students' t-testで検討した結果、19P2-L31無添加の場合に比べ、危険率0.01以下で有意であることを表す。また、\*を付した点は、students' t-testで検討した結果19P2-L31無添加の場合に比べ、危険率0.05以下で有意であることを表す。

#### 【0128】

##### 【製剤例1】

日局注射用蒸留水50mlに実施例21で得られた化合物50mgを溶解した後、日局注射用蒸留水を加えて100mlとした。この溶液を滅菌条件下で濾過し、次にこの溶液1mlずつを取り滅菌条件下注射用バイアルに充填し凍結乾燥し密閉した。

【0129】

【製剤例2】

日局注射用蒸留水50mlに実施例21で得られた化合物100mgを溶解した後、日局注射用蒸留水を加えて100mlとした。この溶液を滅菌条件下で濾過し、次にこの溶液1mlずつを取り滅菌条件下注射用バイアルに充填し凍結乾燥し密閉した。

【0130】

【発明の効果】

本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌の促進および抑制作用を有する。即ち、本発明におけるリガンドポリペプチドは、後述の実施例から明らかなように、まずプロラクチン分泌の促進作用を有するため、プロラクチン分泌不全に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。一方、本発明におけるリガンドポリペプチドは、そのレセプター蛋白質との親和性が強いので、投与量が増えるとプロラクチン分泌に対し脱感作（desensitization）が起こる結果、プロラクチン分泌を抑制する作用も有する。この場合、プロラクチン過剰分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。

従って、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精囊発育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

また、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル（Chiari-Frommel）症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ（Argonz-del Castilo）症候群、フォーベス・アルブライト（Forbes-Albright）症候群、乳癌などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。

本発明におけるリガンドポリペプチドは、とりわけ、高プロラクチン血症、乳汁分泌不全、自己免疫疾患、乳癌の予防および治療薬として有用である。



その他、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、牛、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

【0131】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：98

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Lys	Ala	Val	Gly	Ala	Trp	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu
1				5					10				15	
Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Ala	Ser	Arg	Ala	His	Gln	His	Ser	Met	Glu
				20					25				30	Ile
Arg	Thr	Pro	Asp	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Tyr	Ala	Gly	Arg	Gly	Ile
				35				40					45	Arg
Pro	Val	Gly	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Ala	Ala	Pro	Gly	Asp	Gly
				50				55					60	Pro
Arg	Pro	Gly	Pro	Arg	Arg	Val	Pro	Ala	Cys	Phe	Arg	Leu	Glu	Gly
				65				70					75	80
Ala	Glu	Pro	Ser	Arg	Ala	Leu	Pro	Gly	Arg	Leu	Thr	Ala	Gln	Leu
				85					90				95	Val
Gln	Glu													

【0132】

【配列番号：2】

配列の長さ：294

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

```

ATGAAGGCGG TGGGGGCTG GCTCCTCTGC CTGCTGCTGC TGGGCCTGGC CCTGCAGGGG    60
GCTGCCAGCA GAGCCCACCA GCACTCCATG GAGATCCGCA CCCCCGACAT CAACCCTGCC    120
TGGTACGCRG GCCGTGGGAT CCGGCCCCGTG GGCCGCTTCG GCCGGCGAAG AGCTGCCCYG    180
GGGGACGGAC CCAGGCCTGG CCCCCGGCGT GTGCCGGCCT GCTTCCGCCT GGAAGGCGGY    240
GCTGAGCCCT CCCGAGCCCT CCCGGGGCGG CTGACGGCCC AGCTGGTCCA GGAA          294
  
```

【0133】

【配列番号：3】

配列の長さ：29

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly

20 25

【0134】

【配列番号：4】

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg

19

【0135】

【配列番号：5】

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

【0136】

【配列番号：6】

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

【0137】

【配列番号：7】

配列の長さ：33

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

33

【0138】

【配列番号：8】

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

【0139】

【配列番号：9】

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15  
Val Gly Arg Phe Gly  
20

【0140】

【配列番号：10】

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15  
Val Gly Arg Phe Gly Arg  
20

【0141】

【配列番号：11】

配列の長さ：87

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60  
GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGC 87

【0142】

【配列番号：12】

配列の長さ：57

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ACCCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCCGT GGGCCCGC 57

【0143】

【配列番号：13】

配列の長さ：93

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60

GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCCGC TTC 93

【0144】

【配列番号：14】

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60

GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCCGC TTCGGC 96

【0145】

【配列番号：15】

配列の長さ：99

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

---

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCGG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60  
GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCGC TTCGGCCGG 99

【0146】

【配列番号：16】

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ACCCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60

【0147】

【配列番号：17】

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ACCCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60  
GGC 63

【0148】

【配列番号：18】

配列の長さ：66

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

---

ACCCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60  
GGCCGG 66

【0149】

【配列番号：19】

配列の長さ：91

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Val Leu Val Ile Ala Arg Val Arg Arg Leu His Asn Val Thr Asn

1 5 10 15

Phe Leu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Val Leu Met Cys Thr Ala

20 25 30

Cys Val Pro Leu Thr Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Pro Arg Gly Trp Val

35 40 45

Phe Gly Gly Gly Leu Cys His Leu Val Phe Phe Leu Gln Pro Val Thr

50 55 60

Val Tyr Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Thr Ile Ala Val Asp Arg Tyr

65 70 75 80

Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile

85 90

【0150】

【配列番号：20】

配列の長さ：59

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状



配列の種類：ペプチド

配列

Gly Leu Leu Leu Val Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Val Ile Leu Leu

1 5 10 15

Ser Tyr Val Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val Val Pro Gly

20 25 30

Cys Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg Arg Arg Arg

35 40 45

Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val Val

50 55

【0151】

【配列番号：21】

配列の長さ：370

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Ser Ser Thr Thr Arg Gly Pro Arg Val Ser Asp Leu Phe Ser

1 5 10 15

Gly Leu Pro Pro Ala Val Thr Thr Pro Ala Asn Gln Ser Ala Glu Ala

20 25 30

Ser Ala Gly Asn Gly Ser Val Ala Gly Ala Asp Ala Pro Ala Val Thr

35 40 45

Pro Phe Gln Ser Leu Gln Leu Val His Gln Leu Lys Gly Leu Ile Val

50 55 60

Leu Leu Tyr Ser Val Val Val Val Val Gly Leu Val Gly Asn Cys Leu

65 70 75 80

Leu Val Leu Val Ile Ala Arg Val Arg Arg Leu His Asn Val Thr Asn

85 90 95

Phe Leu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Val Leu Met Cys Thr Ala

100

105

110

Cys Val Pro Leu Thr Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Pro Arg Gly Trp Val

115

120

125

Phe Gly Gly Gly Leu Cys His Leu Val Phe Phe Leu Gln Pro Val Thr

130

135

140

Val Tyr Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Thr Ile Ala Val Asp Arg Tyr

145

150

155

160

Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile Ser Leu Arg Leu Ser

165

170

175

Ala Tyr Ala Val Leu Ala Ile Trp Ala Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu

180

185

190

Pro Ala Ala Val His Thr Tyr His Val Glu Leu Lys Pro His Asp Val

195

200

205

Arg Leu Cys Glu Glu Phe Trp Gly Ser Gln Glu Arg Gln Arg Gln Leu

210

215

220

Tyr Ala Trp Gly Leu Leu Leu Val Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Val

225

230

235

240

Ile Leu Leu Ser Tyr Val Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val

245

250

255

Val Pro Gly Cys Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg

260

265

270

Arg Arg Arg Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val Phe Ala

275

280

285

Val Cys Trp Leu Pro Leu His Val Phe Asn Leu Leu Arg Asp Leu Asp

290

295

300

Pro His Ala Ile Asp Pro Tyr Ala Phe Gly Leu Val Gln Leu Leu Cys

305

310

315

320

His Trp Leu Ala Met Ser Ser Ala Cys Tyr Asn Pro Phe Ile Tyr Ala

325 330 335  
Trp Leu His Asp Ser Phe Arg Glu Glu Leu Arg Lys Leu Leu Val Ala

340 345 350

Trp Pro Arg Lys Ile Ala Pro His Gly Gln Asn Met Thr Val Ser Val

355 360 365

Val Ile

370

【0152】

【配列番号：22】

配列の長さ：206

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Val Leu Val Ile Ala Arg Val Arg Arg Leu Tyr Asn Val Thr Asn

1 5 10 15

Phe Leu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Val Leu Met Cys Thr Ala

20 25 30

Cys Val Pro Leu Thr Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Pro Arg Gly Trp Val

35 40 45

Phe Gly Gly Gly Leu Cys His Leu Val Phe Phe Leu Gln Ala Val Thr

50 55 60

Val Tyr Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Thr Ile Ala Val Asp Arg Tyr

65 70 75 80

Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile Ser Leu Arg Leu Ser

85 90 95

Ala Tyr Ala Val Leu Ala Ile Trp Val Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu

100 105 110

Pro Ala Ala Val His Thr Tyr His Val Glu Leu Lys Pro His Asp Val

特平 9-165437

115	120	125
Arg Leu Cys Glu Glu Phe Trp Gly Ser Gln Glu Arg Gln Arg Gln Leu		
130	135	140
<hr/>		
Tyr Ala Trp Gly Leu Leu Leu Val Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Val		
145	150	155
Ile Leu Leu Ser Tyr Ala Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val		
165	170	175
Val Pro Gly Arg Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg		
180	185	190
Arg Arg Arg Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val Val		
195	200	205

【0153】

【配列番号：23】

配列の長さ：126

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile Ser Leu Arg Leu Ser
1                      5                      10                      15
Ala Tyr Ala Val Leu Gly Ile Trp Ala Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu
20                      25                      30
Pro Ala Ala Val His Thr Tyr His Val Glu Leu Lys Pro His Asp Val
35                      40                      45
Ser Leu Cys Glu Glu Phe Trp Gly Ser Gln Glu Arg Gln Arg Gln Ile
50                      55                      60
Tyr Ala Trp Gly Leu Leu Leu Gly Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala
65                      70                      75                      80
Ile Leu Leu Ser Tyr Val Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val

85 90 95  
Val Pro Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg  
100 105 110

Arg Arg Arg Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val Val  
115 120 125

【0154】

【配列番号：24】

配列の長さ：273

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

CTGGTGCTGG TGATCGCGCG GGTGCGCCGG CTGCACAACG TGACGAACTT CCTCATCGGC 60  
AACCTGGCCT TGTCCGACGT GCTCATGTGC ACCGCCTGCG TGCCGCTCAC GCTGGCCTAT 120  
GCCTTCGAGC CACGCGGCTG GGTGTTCCGGC GGC GGCCCTGT GCCACCTGGT CTTCTTCCTG 180  
CAGCCGGTCA CCGTCTATGT GTCGGTGTTC ACGCTCACCA CCATCGCAGT GGACCGGTAC 240  
GTCGTGCTGG TGCACCCGCT GAGGCGGCGC ATC 273

【0155】

【配列番号：25】

配列の長さ：177

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GGCCTGCTGC TGGTCACCTA CCTGCTCCCT CTGCTGGTCA TCCTCCTGTC TTACGTCCGG 60

GTGTCAGTGA AGCTCCGCAA CCGCGTGGTG CCGGGCTGCG TGACCCAGAG CCAGGCCGAC 120  
TGGGACCGCG CTCGGCGCCG GCGCACCTTC TGCTTGCTGG TGGTGGTCGT GGTGGTG 177

【0156】

【配列番号：26】

配列の長さ：1110

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ATGGCCTCAT CGACCACTCG GGGCCCCAGG GTTCTGACT TATTTTCTGG GCTGCCGCCG 60  
GCGGTCACAA CTCCCGCCAA CCAGAGCGCA GAGGCCTCGG CGGGCAACGG GTCGGTGGCT 120  
GGCGCGGACG CTCCAGCCGT CACGCCCTTC CAGAGCCTGC AGCTGGTGCA TCAGCTGAAG 180  
GGGCTGATCG TGCTGCTCTA CAGCGTCGTG GTGGTCGTGG GGCTGGTGGG CAACTGCCTG 240  
CTGGTGCTGG TGATCGCGCG GGTGCGCCGG CTGCACAACG TGACGAACTT CCTCATCGGC 300  
AACCTGGCCT TGTCCGACGT GCTCATGTGC ACCGCCTGCG TGCCGCTCAC GCTGGCCTAT 360  
GCCTTCGAGC CACGCGGCTG GGTGTTCCGG GCGGGCCTGT GCCACCTGGT CTTCTTCCTG 420  
CAGCCGGTCA CCGTCTATGT GTCGGTGTTC ACGCTACCA CCATCGCAGT GGACCGCTAC 480  
GTCGTGCTGG TGCACCCGCT GAGGCGGCGC ATCTCGCTGC GCCTCAGCGC CTACGCTGTG 540  
CTGGCCATCT GGGCGCTGTC CGCGGTGCTG GCGCTGCCCC CCGCCGTGCA CACCTATCAC 600  
GTGGAGCTCA AGCCGCACGA CGTGCGCCTC TGCGAGGAGT TCTGGGGCTC CCAGGAGCGC 660  
CAGCGCCAGC TCTACGCCTG GGGGCTGCTG CTGGTCACCT ACCTGCTCCC TCTGCTGGTC 720  
ATCCTCCTGT CTTACGTCCG GGTGTCAGTG AAGCTCCGCA ACCGCGTGGT GCCGGGCTGC 780  
GTGACCCAGA GCCAGGCCGA CTGGGACCGC GCTCGGCGCC GGCGCACCTT CTGCTTGCTG 840  
TGGTGGTCG TGGTGGTGTT CGCCGTCTGC TGGCTGCCGC TGCACGTCTT CAACCTGCTG 900  
CGGGACCTCG ACCCCACGC CATCGACCCT TACGCCTTTG GGCTGGTGCA GCTGCTCTGC 960  
CACTGGCTCG CCATGAGTTC GGCCTGCTAC AACCCTTCA TCTACGCCTG GCTGCACGAC 1020  
AGCTCCGCG AGGAGCTGCG CAAACTGTTG GTCGCTTGGC CCCGCAAGAT AGCCCCCAT 1080

GGCCAGAATA TGACCGTCAG CGTGGTCATC

1110

【0157】

【配列番号：27】

配列の長さ：618

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

CTGGTGCTGG TGATCGCGCG GGTGCGCCGG CTGTACAACG TGACGAATTT CCTCATCGGC	60
AACCTGGCCT TGTCCGACGT GCTCATGTGC ACCGCCTGCG TGCCGCTCAC GCTGGCCTAT	120
GCCTTCGAGC CACGCGGCTG GGTGTTCCGG GCGGGCCTGT GCCACCTGGT CTTCTTCCTG	180
CAGGCGGTCA CCGTCTATGT GTCGGTGTTT ACGCTCACCA CCATCGCAGT GGACCGCTAC	240
GTCGTGCTGG TGCACCCGCT GAGGCGGCGC ATCTCGCTGC GCCTCAGCGC CTACGCTGTG	300
CTGGCCATCT GGGTGCTGTC CGCGGTGCTG GCGCTGCCCC CCGCCGTGCA CACCTATCAC	360
GTGGAGCTCA AGCCGCACGA CGTGCGCCTC TGCGAGGAGT TCTGGGGCTC CCAGGAGCGC	420
CAGCGCCAGC TCTACGCCTG GGGGCTGCTG CTGGTCACCT ACCTGCTCCC TCTGCTGGTC	480
ATCCTCCTGT CTTACGCCCC GGTGTCAGTG AAGCTCCGCA ACCGCGTGGT GCCGGGCCGC	540
GTGACCCAGA GCCAGGCCGA CTGGGACCGC GCTCGGCGCC GGCGCACCTT CTGCTTGCTG	600
GTGGTGGTCG TGGTGGTG	618

【0158】

【配列番号：28】

配列の長さ：378

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

GTGGTTCTGG TGCACCCGCT ACGTCGGCGC ATTTCACTGA GGCTCAGCGC CTACGCGGTG	60
CTGGGCATCT GGGCTCTATC TGCAGTGCTG GCGCTGCCGG CCGCGGTGCA CACCTACCAT	120
GTGGAGCTCA AGCCCCACGA CGTGAGCCTC TGCGAGGAGT TCTGGGGCTC GCAGGAGCGC	180
CAACGCCAGA TCTACGCCTG GGGGCTGCTT CTGGGCACCT ATTTGCTCCC CCTGCTGGCC	240
ATCCTCCTGT CTTACGTACG GGTGTCAGTG AAGCTGAGGA ACCGCGTGGT GCCTGGCAGC	300
GTGACCCAGA GTCAAGCTGA CTGGGACCGA GCGCGTCGCC GCCGCACTTT CTGTCTGCTG	360
GTGGTGGTGG TGGTAGTG	378

【0159】

【配列番号：29】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTGGSCMTS STGGGCAACN YCCTG	25
-----------------------------	----

【0160】

【配列番号：30】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

【0161】

GTNGWRRGGC ANCCAGCAGA KGGCAAA	27
-------------------------------	----



【0162】

【配列番号：31】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGTGYGYSA TYGCNNTKGA YMGSTAC 27

【0163】

【配列番号：32】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AKGWAGWAGG GCAGCCAGCA GANSRYGAA 29

【0164】

【配列番号：33】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGACTTATT TTCTGGGCTG CCGC 24

【0165】

【配列番号：34】

配列の長さ：24

---

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AACACCGACA CATAGACGGT GACC 24

【0166】

【配列番号：35】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCICAYCARC AYTGYATGGA 20

【0167】

【配列番号：36】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCACGGGIC KDATGCCICK GCCIGC 26

【0168】

【配列番号：37】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACGGGCCCKDA TGCCICKGCC IGCRTA 26

【0169】

【配列番号：38】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGGCGTACC AGGCAGGGTT 20

【0170】

【配列番号：39】

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGCAGGGTT GATGTCGGGG GTGCGGAT 28

【0171】

【配列番号：40】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGCCAGCAG AGCCCACCAG CACTCCA 27

【0172】

【配列番号：41】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGGGGGCCT GGCTCCTCTG CCTGCTG 27

【0173】

【配列番号：42】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGTCGACGA ATGAAGGCCG TGGGGGCCTG GC 32

【0174】

【配列番号：43】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGCTCCCGC TGTTATTCCT GGAC 24

【0175】

【配列番号：44】

配列の長さ：98

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Lys Ala Val Gly Ala Trp Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu

1 5 10 15

Ala Leu Gln Gly Ala Ala Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile

20 25 30

Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg

35 40 45

Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Ala Leu Gly Asp Gly Pro

50 55 60

Arg Pro Gly Pro Arg Arg Val Pro Ala Cys Phe Arg Leu Glu Gly Gly

65 70 75 80

Ala Glu Pro Ser Arg Ala Leu Pro Gly Arg Leu Thr Ala Gln Leu Val

85 90 95

Gln Glu

【0176】

【配列番号：45】

配列の長さ：83

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Leu Lys Thr Trp Leu Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ser Leu Val

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Ser Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg

20 25 30

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

35 40 45

Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Thr Pro Arg Asp Val Thr Gly

50 55 60

Leu Gly Gln Leu Ser Cys Leu Pro Leu Asp Gly Arg Thr Lys Phe Ser

65 70 75 80

Gln Arg Gly

【0177】

【配列番号：46】

配列の長さ：249

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ATGGCCCTGA AGACGTGGCT TCTGTGCTTG CTGCTGCTAA GCTTGGTCCT CCCAGGGGCT 60

TCCAGCCGAG CCCACCAGCA CTCCATGGAG ACAAGAACCC CTGATATCAA TCCTGCCTGG 120

TACACGGGCC GCGGGATCAG GCCTGTGGGC CGCTTCGGCA GGAGAAGGGC AACCCCGAGG 180  
 GATGTCACTG GACTTGGCCA ACTCAGCTGC CTCCCACTGG ATGGACGCAC CAAGTTCTCT 240  
 CAGCGTGGA 249

【0178】

【配列番号：47】

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

【0179】

【配列番号：48】

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

【0180】

【配列番号：49】

配列の長さ：33

配列の型：アミノ酸

特平 9-165437

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

【0181】

【配列番号：50】

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

【0182】

【配列番号：51】

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly



20

【0183】

【配列番号：52】

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

【0184】

【配列番号：53】

配列の長さ：93

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60

ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTC 93

【0185】

【配列番号：54】

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60

ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGC 96

【0186】

【配列番号：55】

配列の長さ：99

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60

ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGCAGG 99

【0187】

【配列番号：56】

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ACCCCTGATA TCAATCTGC CTGGTACACG GGCCGCGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

【0188】

【配列番号：57】

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGCCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60  
GGC 63

【0189】

【配列番号：58】

配列の長さ：66

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGCCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60  
GGCAGG 66

【0190】

【配列番号：59】

配列の長さ：87

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Lys Val Leu Arg Ala Trp Leu Leu Cys Leu Leu Met Leu Gly Leu

1 5 10 15

Ala Leu Arg Gly Ala Ala Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile

特平 9-165437

20 25 30  
Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg  
35 40 45  
Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Thr Leu Gly Asp Val Pro  
50 55 60  
Lys Pro Gly Leu Arg Pro Arg Leu Thr Cys Phe Pro Leu Glu Gly Gly  
65 70 75 80  
Ala Met Ser Ser Gln Asp Gly

85

【0191】

【配列番号：60】

配列の長さ：261

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ATGAAGGTGC TGAGGGCCTG GCTCCTGTGC CTGCTGATGC TGGGCCTGGC CCTGCGGGGA 60  
GCTGCAAGTC GTACCCATCG GCACTCCATG GAGATCCGCA CCCCTGACAT CAATCCTGCC 120  
TGGTACGCCA GTCGCGGGAT CAGGCCTGTG GGCCGCTTCG GTCGGAGGAG GGCAACCCTG 180  
GGGGACGTCC CCAAGCCTGG CCTGCGACCC CGGCTGACCT GCTTCCCCCT GGAAGGCGGT 240  
GCTATGTCGT CCCAGGATGG C 261

【0192】

【配列番号：61】

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

【0193】

【配列番号：62】

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

【0194】

【配列番号：63】

配列の長さ：33

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

【0195】

【配列番号：64】

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

【0196】

【配列番号：65】

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly

20

【0197】

【配列番号：66】

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

【0198】

【配列番号：67】

配列の長さ：93

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60  
GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTC 93

【0199】

【配列番号：68】

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60  
GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGT 96

【0200】

【配列番号：69】

配列の長さ：99

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

---

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60

GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGTCGG 99

【0201】

【配列番号：70】

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

【0202】

【配列番号：71】

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

GGT 63



【0203】

【配列番号：72】

配列の長さ：66

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60  
GGTCGG 66

【0204】

【配列番号：73】

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：第10番目のXaaはAlaもしくはThr、第11番目のXaaはGlyもしくはSer、第21番目のXaaはH、GlyもしくはGlyArgを示す。

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Xaa Xaa Arg Gly Ile Arg Pro  
1 5 10 15  
Val Gly Arg Phe Xaa  
20

【0205】

【配列番号：74】

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：第3番目のXaaはAlaもしくはThr、第5番目のXaaはGlnもしくはArg、第10番目のXaaはIleもしくはThrを示す。

配列

Ser Arg Xaa His Xaa His Ser Met Glu Xaa Arg

1 5 10

【0206】

【配列番号：75】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CARCAYTCCA TGGAGACAAG AACCCC 26

【0207】

【配列番号：76】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TACCAGGCAG GATTGATACA GGGG 24

【0208】

【配列番号：77】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCATCATCC AGGAAGACGG AGCAT 25

【0209】

【配列番号：78】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCAGAGGAG AGGGAGGGTA GAGGA 25

【0210】

【配列番号：79】

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACGTGGCTTC TGTGCTTGCT GC 22

【0211】

【配列番号：80】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCTGATCCC GCGGCCCCGTG TACCA 25

【0212】

【配列番号：81】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGCCCTTCT CCTGCCGAAG CGGCCC 26

【0213】

【配列番号：82】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCGGGGGCT GCAAGTCGTA CCCATCG 27

【0214】

【配列番号：83】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGGCACTCCA TGGAGATCCG CACCCCT 27

【0215】

【配列番号：84】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAGGCAGGAT TGATGTCAGG GGTGCGG 27

【0216】

【配列番号：85】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATGGAGTGC CGATGGGTAC GACTTGC 27

【0217】

【配列番号：86】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCCTCCTCG GAGGAGCCAA GGGATGA 27

【0218】

【配列番号：87】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGAAAGGAG CCCGAAGGAG AGGAGAG 27

【0219】

【配列番号：88】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTGCTGGCC ATTCTCCTGT CTTAC 25

【0220】

【配列番号：89】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGTCCAGGT CCCGCAGAAG GTTGA 25

【0221】

【配列番号：90】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAAGACGGAG CATGGCCCTG AAGAC 25

【0222】

【配列番号：91】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCAGCTGAG TTGGCCAAGT CCAGT 25

【0223】

【配列番号：92】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Cys

1

5

10

15

【0224】

【配列番号：93】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

1 5 10 15

【0225】

【配列番号：94】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly

1 5 10 15

【0226】

【配列番号：95】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGATTGGCAT CATCCAGGAA GACGGAGCAT 30



【0227】

【配列番号：96】

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTGACTCGA CAGCACTGTC TTCTCGAGCT G 31

【0228】

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト下垂体由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンp19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。配列決定に用いたプライマーは-21M13である。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図2】ヒト下垂体由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンp19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。配列決定に用いたプライマーはM13RV-N（タカラ）である。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図3】図1に示したアミノ酸配列をもとに作成した、p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図4】図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した、p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図5】図1および図2に示したp19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分アミノ酸配列

を、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるS12863と比較した図を示す。黒く塗った部分は一致している部分を示す。p19P2の第1番目～第99番目のアミノ酸配列は図1の第1番目～第99番目のアミノ酸配列に対応し、第156番目～第230番目のアミノ酸配列は図2の第1番目～第68番目のアミノ酸配列に対応する。

【図6】MIN6由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンpG3-2およびpG1-10にそれぞれ含まれるMIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列に基づいて導き出したMIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図7】図6に示したMIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列（pG3-2/pG1-10）を、図1および図2に示したp19P2にコードされる蛋白質の部分アミノ酸配列と比較した図を示す。黒塗りの部分は配列が一致している部分を示す。p19P2の第1番目～第99番目のアミノ酸配列は図1の第1番目～第99番目のアミノ酸配列に対応し、第156番目～第223番目のアミノ酸配列は図2の第1番目～第68番目のアミノ酸配列に対応する。pG3-2/pG1-10の第1番目～第223番目のアミノ酸配列は図6の第1番目～第223番目のアミノ酸配列に対応する。

【図8】図6に示した部分アミノ酸配列をもとに作成した、MIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図9】p19P2に挿入されているDNA断片をプローブとして用いて、ヒト下垂体由来cDNAライブラリーよりブランクハイブリダイゼーション法によって単離したcDNAクローンphGR3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図10】ヒト下垂体由来のcDNAクローンphGR3がコードするレセプター遺伝子のヒト下垂体mRNAに対するノーザンプロットの結果を示す。

【図11】図9に示したアミノ酸配列をもとに作成した、p h G R 3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAにコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。

【図12】MIN 6由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンp 5 S 3 8に含まれるMIN 6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図13】図12に示したMIN 6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列(p 5 S 3 8)を、図1および図2に示したp 1 9 P 2に含まれるcDNA断片にコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列、および図6に示したp G 3 - 2ならびにp G 1 - 1 0にそれぞれ含まれるcDNA断片の塩基配列から導きだした塩基配列にコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列と比較した図を示す。黒塗りの部分は配列が一致している部分を示す。p 5 S 3 8の第1番目～第144番目のアミノ酸配列は図12の第1番目～第144番目のアミノ酸配列に対応する。p 1 9 P 2の第1番目～第99番目のアミノ酸配列は図1の第1番目～第99番目のアミノ酸配列に対応し、第156番目～第223番目のアミノ酸配列は図2の第1番目～第68番目のアミノ酸配列に対応する。p G 3 - 2 / p G 1 - 1 0の第1番目～第223番目のアミノ酸配列は図6の第1番目～第223番目のアミノ酸配列に対応する。

【図14】図12に示した部分アミノ酸配列をもとに作成した、p 5 S 3 8に含まれるMIN 6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図15】pAKK0-19P2を導入したCHO細胞でmRNAが発現していることを確認するためにRT-PCRを行った。レーン1から7は比較のためにpAKK0-19P2を段階的に希釈してPCRを行ったもので、10  $\mu$ g /  $\mu$ lのプラスミドをそれぞれ原液(レーン1)、1/2希釈(レーン2)、1/4希釈(レーン3)、1/64希釈(レーン4)、1/256希釈(レーン5)、1/1024希釈(レーン6)、1/4096希釈(レーン7)した鋳型を使ってPCRを行ったものについて1.2%アガロースゲル電気泳動により解析し

た結果である。レーン 8 から 11 は CHO-19P2 細胞株から調製した cDNA をそれぞれ 1/10 希釈 (レーン 8)、1/100 希釈 (レーン 9)、1/1000 希釈 (レーン 10) したものを鋳型として PCR を行ったものを電気泳動した。レーン 11 は cDNA の合成を reverse transcriptase なしで行ったものを鋳型として PCR を行ったものを電気泳動した。レーン 12 および 13 はそれぞれ mock CHO 細胞から reverse transcriptase 添加および無添加で調製した cDNA を鋳型として PCR を行ったものを電気泳動した。M は DNA のサイズマーカーであり両端のレーンは  $\lambda$ /Sty I digest (ニッポンジーン) を右から 2 番目は  $\phi$  x 174/Hinc II digest (ニッポンジーン) をそれぞれ 1  $\mu$ g を電気泳動した。矢印は約 400bp の PCR により増幅されたバンドの位置を示している。

【図 16】ラット全脳から抽出した粗リガンドペプチド画分について CHO-19P2 細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。アラキドン酸代謝物の遊離促進活性は 0.05%BSA を含む HBSS を加えた時に遊離された [ $^3$ H] アラキドン酸代謝物の量を 100% として、リガンドペプチド粗画分を加えた時に放出されるアラキドン酸代謝物の量を % として表した。30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  の画分に CHO-19P2 細胞株からアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が認められた。

【図 17】ウシ視床下部から抽出した粗リガンドペプチド画分について CHO-19P2 細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。アラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性は 0.05%BSA を含む HBSS を加えた時に遊離された [ $^3$ H] アラキドン酸代謝物の量を 100% として、リガンドペプチド粗画分を加えた時に放出されるアラキドン酸代謝物の量を % として表した。ラット全脳から抽出した粗リガンドペプチド画分と同様に 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  の画分に CHO-19P2 細胞株からアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が認められた。

【図 18】逆相カラム C18 218TP5415 で精製した画分について CHO-19P2 細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。RESOURCE S の活性画分を C18 218TP5415 で分離した。流速 1ml/min、20%-30%  $\text{CH}_3\text{CN}$ /0.1%TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  の濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を 1ml ずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれる CHO-19P2 細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離促進活性を測定した。その結果、活性は、3 つ (溶出順にそれぞれ P-1、

P-2、P-3と呼ぶ)に分離した。

【図19】逆相カラム diphenyl 219TP5415 で精製した画分についてCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。C18 218TP5415 のP-3活性画分を diphenyl 219TP5415 で分離した。流速 1ml/min、22%-25% CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA/H<sub>2</sub>O の濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を1ml ずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離促進活性を測定した。その結果、活性は1つのピークに収束した。

【図20】逆相カラム  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 で精製した画分についてCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。diphenyl 219TP5415 で活性と一致したピークの画分を  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 で分離した。流速 100  $\mu$ l/min、22%-23.5% CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA/H<sub>2</sub>O の濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を100  $\mu$ l ずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離促進活性を測定した。その結果、活性は単一の物質(ペプチド)と思われる二つのピークに一致した。

【図21】逆相カラム  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10 で精製したP-2画分についてCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。流速 100  $\mu$ l/min、21.5%-23.0% CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA/蒸留水の濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を100  $\mu$ l ずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれるCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。その結果、活性は、単一のペプチドと思われるペプチドのピークに一致した。

【図22】ウシ視床下部由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンに含まれるウシ視床下部由来のCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するリガンドポリペプチドcDNA断片の塩基配列に基づいて導き出した該ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドcDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。矢印で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図23】 ウシ視床下部由来 cDNA を用いて PCR 法によって単離した cDNA クローンに含まれるウシ視床下部由来の CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するリガンドポリペプチド cDNA 断片の塩基配列に基づいて導き出した該ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド cDNA 断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。矢印で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図24】 ウシ視床下部由来の CHO-19P2 細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するリガンドポリペプチドのアミノ酸配列 (a), (b) および配列番号: 1、配列番号 44 に示したリガンドポリペプチドの全コード領域をコードする cDNA 配列である。

【図25】 合成リガンドポリペプチド (19P2-L31) について CHO-19P2 細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性を濃度依存的に測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に  $10^{-3}M$  の濃度で溶解し、0.05% BSA を含む HBSS で  $10^{-12}M \sim 10^{-6}M$  の濃度に希釈した。アラキドン酸代謝物遊離活性は、希釈液を細胞に添加した時に上清に遊離される [ $^3H$ ] アラキドン酸代謝物の実測放射線量で表した。その結果、19P2-L31 による CHO-19P2 細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が濃度依存的に認められた。

【図26】 合成リガンドポリペプチド (19P2-L31 (O)) について CHO-19P2 細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性を濃度依存的に測定した。合成リガンドポリペプチドは、脱気処理した蒸留水に  $10^{-3}M$  の濃度で溶解し、0.05% BSA を含む HBSS で  $10^{-12}M \sim 10^{-6}M$  の濃度に希釈した。アラキドン酸代謝物遊離活性は、希釈液を細胞に添加した時に上清に遊離される [ $^3H$ ] アラキドン酸代謝物の実測放射線量で表した。その結果、19P2-L31 (O) による CHO-19P2 細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が濃度依存的に認められた。

【図27】 合成リガンドポリペプチド 19P2-L20 について CHO-19P2 細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性を濃度依存的に測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に  $10^{-3}M$  の濃度で溶解し、0.05% B

SAを含むHBSSで $10^{-12}\text{M} \sim 10^{-6}\text{M}$ の濃度に希釈した。アラキドン酸代謝物遊離活性は、希釈液を細胞に添加した時に上清に遊離される $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の実測放射線量で表した。その結果、19P2-L20によるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が濃度依存的に認められた。

【図28】ウシゲノムライブラリーよりクローン化したファージのDNAを制限酵素BamHI (B) およびSalI (S) で切断し、1.2%アガロースゲル電気泳動を行ったパターンを示す。DNAのサイズマーカー (M) には $\lambda$ ファージDNAのStyI消化物を用いた。Bのレーンではマーカーの1番目 (19,329bp) と2番目 (7,743bp) のバンドの間に相当する位置にベクター由来の2本のバンドが検出され、その他に3番目 (6,223bp) から5番目 (3,472bp) の間に挿入断片由来の3本のバンドが検出された。Sのレーンでは同じくベクター由来の2本のバンドが検出されているが、挿入断片由来のバンドが重なっているために上側のバンドがBのレーンに比べて太くなっている。

【図29】ウシゲノムDNAから解読したコード領域付近の塩基配列を示す。1～3番目の塩基 (ATG) が翻訳開始コドンに相当し、767～769番目の塩基 (TAA) が翻訳終止コドンに相当する。

【図30】ウシゲノムDNAから解読したコード領域付近の塩基配列 (genome) をPCR法によってクローニングしたウシcDNAの塩基配列 (cDNA) と比較した結果を示す。配列の一致している部分は網掛けで示した。101番目～572番目の部分はcDNAの塩基配列には相当する部分が無く、イントロンであることが判明した。

【図31】ウシゲノムDNAから解読したコード領域付近の塩基配列からイントロン部分を除き、コードされるアミノ酸配列に翻訳した結果を示す。

【図32】ラット型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列および全コード領域をコードするcDNA配列である。

【図33】ウシ型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列およびウシ型ポリペプチド、ラット型ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。矢印で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図34】 ヒト型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列および全コード領域をコードするcDNA配列である。

【図35】 ウシ型リガンドポリペプチド、ラット型リガンドポリペプチドおよびヒト型リガンドポリペプチドの翻訳領域についてアミノ酸配列を比較したものである。

【図36】 生細胞におけるヨードラベル化リガンドポリペプチドを用いたレセプター結合実験の結果を示す。

【図37】 CHO-19P2-9およびCHO-UHR1におけるリガンドポリペプチドによるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定結果を示す。

【図38】 ラット組織におけるUHR-1のRT-PCRによる定量結果を示す。定量値は3回のPCRの平均値S.E.M.で表した。

【図39】 ラット組織におけるリガンドポリペプチドのRT-PCRによる発現定量結果を示す。定量値は3回のPCRの平均値S.E.M.で表した。

【図40】 リガンドポリペプチドのグルコースによる血漿インスリン濃度の増加をラジオイムノアッセイで測定した結果を示す。

【図41】 リガンドポリペプチド10nmolをマウスに投与したときの行動量の測定結果を示す。図(a)は自発運動量、図(b)は立ち上がり行動量の測定結果を示す。

【図42】 リガンドポリペプチド1nmolをマウスに投与したときの行動量の測定結果を示す。図(a)は自発運動量、図(b)は立ち上がり行動量の測定結果を示す。

【図43】 リガンドポリペプチド0.1nmolをマウスに投与したときの行動量の測定結果を示す。図(a)は自発運動量、図(b)は立ち上がり行動量の測定結果を示す。

【図44】 リガンドポリペプチド0.01nmolをマウスに投与したときの行動量の測定結果を示す。図(a)は自発運動量、図(b)は立ち上がり行動量の測定結果を示す。

【図45】 3mg/kgのレセルピンを皮下投与した15時間後のマウスにリガンドポリペプチドを脳室内投与したときの体温変化を測定した結果を示す。図中、一



つの星印は危険率： $p<0.05$ 、二つの星印は $p<0.01$ を示す。

【図46】延髄最後野（area postrema: AP）に角度20度でマイクロインジェクションカニューレを刺した場合の模式図を示す。

【図47】リガンドポリペプチドを延髄最後野に注入したときの脈波および平均血圧の典型例を示す。ラットの延髄最後野にリガンドポリペプチドを10nmol（流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ ）注入し、無麻酔下で測定したものである。

【図48】ペントバルビタール麻酔下ラットの第三脳室に50nmolのリガンドポリペプチドを投与したときの血漿中のGH量を測定した結果を示す。

【図49】第三脳室へのリガンドポリペプチドの投与による血漿中成長ホルモン量の変化を示す。

自由行動下のラットに $5\mu\text{g}/\text{kg}$ のGHRHを静脈下投与し、10分後に第三脳室へリガンドポリペプチドまたはPBSを投与した。ペプチドを投与した時間を0分とした。図中、一つの星印は危険率： $p<0.05$ 、二つの星印は $p<0.01$ を示す。

【図50】リガンドポリペプチド抗血清と吸光度の関係を示す。

【図51】抗リガンドポリペプチドポリクローナル抗体によるアラキドン酸代謝物放出活性の測定結果を示す。

【図52】発現ベクターpAKKO-UHR-1上で構築されたラットUHR-1の完全なコード領域の塩基配列と、それにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図53】プラスミドpmGB3の挿入断片の塩基配列を示す。→はプライマーに相当する部分である。

【図54】プラスミドpmGB3の塩基配列をもとに予測されるcDNAと翻訳蛋白質を予想したものである。→はプライマーに相当する部分である。↓↓に挟まれた部分はイントロンと予想される配列である。

【書類名】 図面

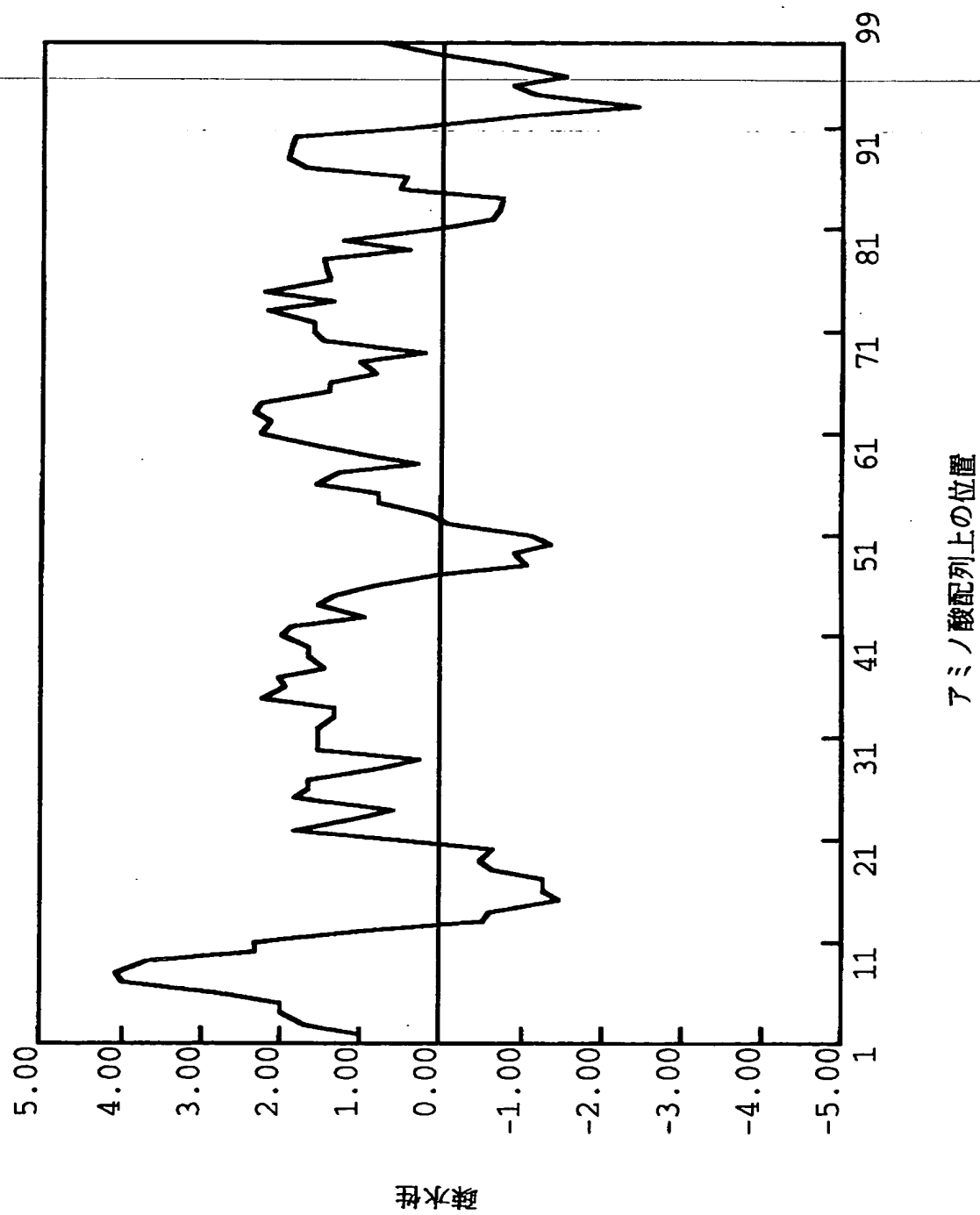
【図 1】

5'	9	18	27	36	45	54
GTG GGC ATG GTG GGC AAC GTC CTG CTG GTG CTG ATC GCG CGG GTG CGC CGG						
Val Gly Met Val Gly Asn Val Leu Leu Val Leu Val Ile Ala Arg Val Arg Arg						
	63	72	81	90	99	108
CTG CAC AAC GTG ACG AAC TTC CTC ATC GGC AAC CTG GCC TTC TCC TCC GAC GTG CTC						
Leu His Asn Val Thr Asn Phe Leu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Val Leu						
	117	126	135	144	153	162
ATG TGC ACC GCC TGC GTG CCG CTC ACG CTC GGC TAT GCC TTC GAG CCA CGC GGC						
Met Cys Thr Ala Cys Val Pro Leu Thr Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Pro Arg Gly						
	171	180	189	198	207	216
TGG GTG TTC GGC GGC GGC CTG TGC CAC CTG GTC TTC TTC CTG CAG CCG GTC ACC						
Trp Val Phe Gly Gly Gly Leu Cys His Leu Val Phe Phe Leu Gln Pro Val Thr						
	225	234	243	252	261	270
GTC TAT GTG TCG GTG TTC ACG CTC ACC ACC ATC GCA GTG GAC CGG TAC GTC GTG						
Val Tyr Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Thr Ile Ala Val Asp Arg Tyr Val Val						
	279	288	297			
CTG GTG CAC CCG CTG AGG CCG CGC ATC 3'						
Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile						

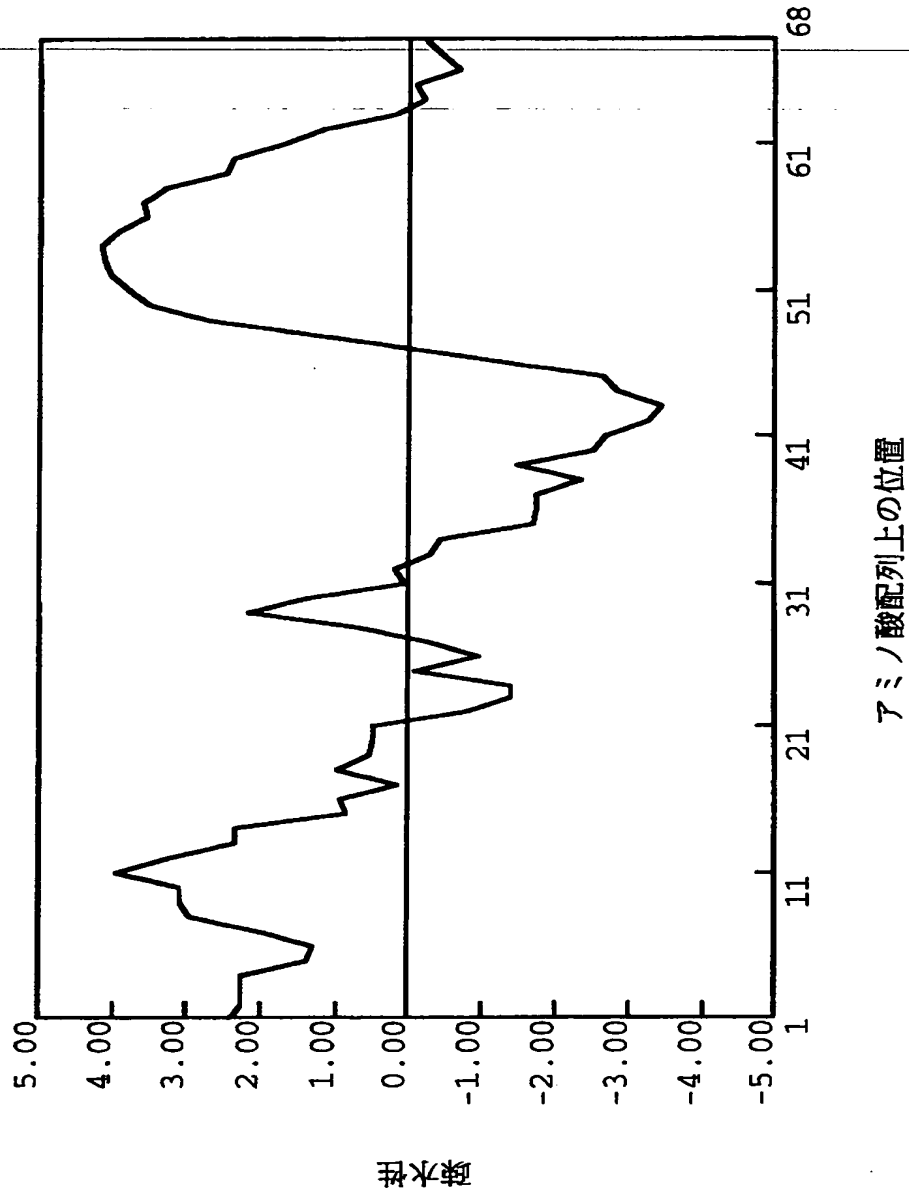
【図2】

5'	GGC	CTG	CTG	CTG	GTC	ACC	TAC	CTG	CTC	CCT	CTG	CTG	ATC	CTC	CTG	TCT	TAC	54
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Gly	Leu	Leu	Val	Thr	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Ser	Tyr	
	63	72	81	90	99	108												
	GTC	CGG	GTG	TCA	GTG	AAG	CTC	CGC	AAC	CGC	GTG	GTG	GGC	TGC	GTG	ACC	CAG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Val	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Cys	Val	Gln	
	117	126	135	144	153	162												
	AGC	CAG	GCC	GAC	TGG	GAC	CGC	GCT	CGG	CGC	CGG	CGC	ACC	TTC	TGC	TTG	GTG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	Cys	Leu	Val	
	171	180	189	198														
	GTG	GTC	GTG	GTG	TTT	GCC	ATC	TGC	TGG	TTG	CCT	TAC	TAC	3'				
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
	Val	Val	Val	Val	Phe	Ala	Ile	Cys	Trp	Leu	Pro	Tyr	Tyr					

【図3】



【図4】



【图 5】

p19P2	1	VGWGNVLE	LV	IARVRLH	NVTNF	LICNL	ALSDVLMCTA	CVPLTAYAF	50
S12863	1	LGVSGNLA	LI	II	ILKQKEMR	NVTNF	LIVNL	SFSDLLAVAM	50
p19P2	51	EPRG	VVEGCG	L	CHLVF	ELQP	VIVYVS	VFTL	100
S12863	51	MDH	VVEGET	MCKLN	PEVQC	VSITV	SIFSL	VLIAVERHQL	100
p19P2	101	-----	110	120	130	140	150	-----	150
S12863	101	NRHAYIGITV	IWVLAVASSL	PFVIYQILTD	EPFQNVSLAA	FKDKYVCFDK	-----	-----	150
p19P2	151	-----GL	LLV	TV	LLPL	LVIL	LS	-----Y	200
S12863	151	FPSDSHRLSY	TV	LLPL	LVIL	LS	-----Y	VRVSVK	200
p19P2	201	ADWDRARRRR	TFCLLV	VW	VFAICWLEFY	-----	-----	-----	250
S12863	201	KYRSSETKRI	NVMLLSI	WA	-FAVCWLP	LT	-----	-----	250

【图6】

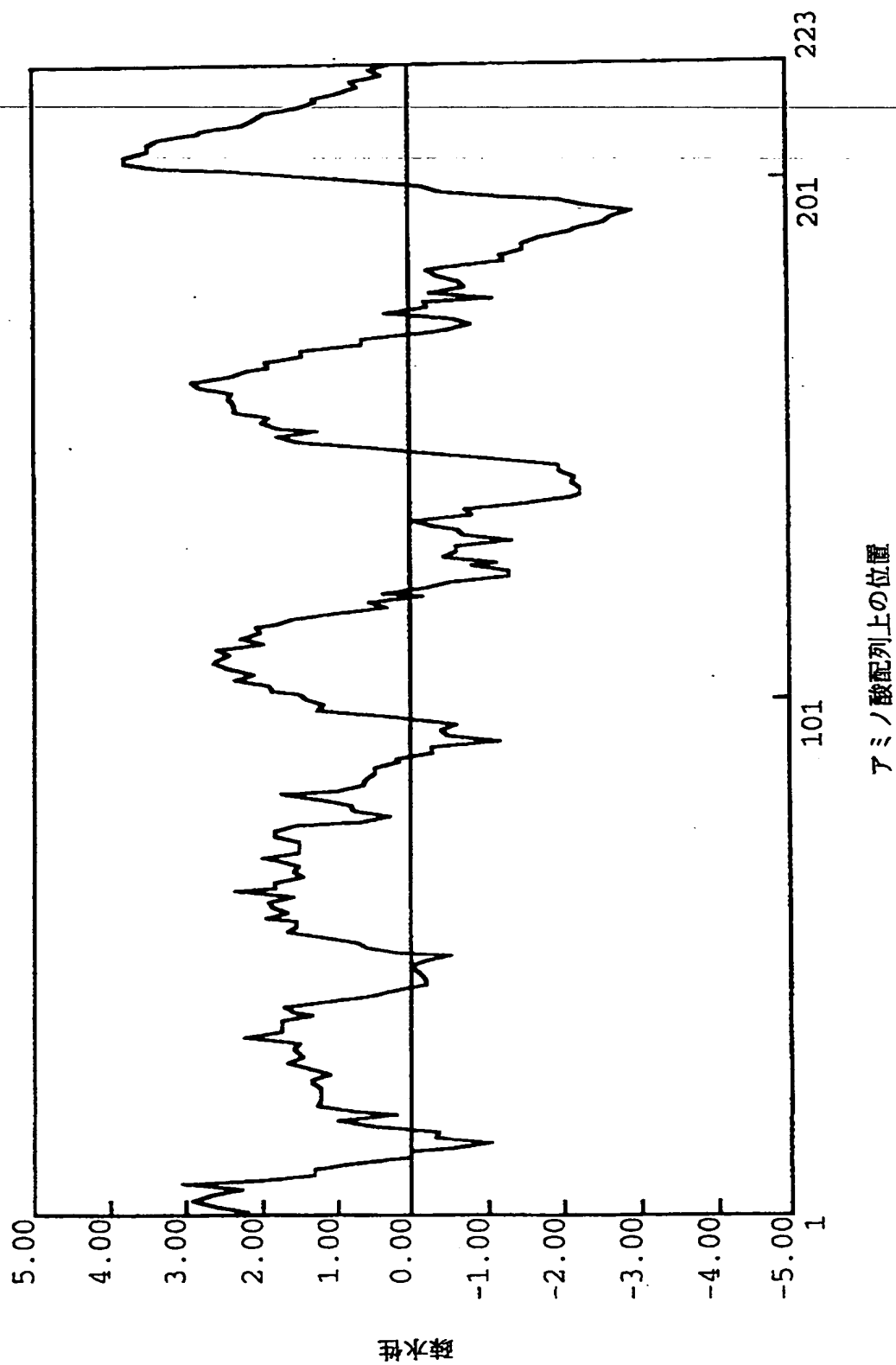
5'	GTG	GGC	ATG	GTG	GGC	AAC	ATC	CTG	CTG	GTG	CTG	GTG	ATC	GGC	CGG	GTG	CGC	CGG
	Val	Gly	Met	Val	Gly	Asn	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Arg
	63					72			81			90			99			108
	CTG	TAC	AAC	GTG	ACG	AAT	TTC	CTC	ATC	GGC	AAC	CTG	GCC	TTC	TCC	GAC	GTG	CTC
	Leu	Tyr	Asn	Val	Thr	Asn	Phe	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Val	Leu
	117					126			135			144			153			162
	ATG	TGC	ACC	GCC	TGC	GTG	CCG	CTC	ACG	CTG	GCC	TAT	GCC	TTC	GAG	CCA	CGC	GGC
	Met	Cys	Thr	Ala	Cys	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Glu	Pro	Arg	Gly
	171					180			189			198			207			216
	TGG	GTG	TTC	GGC	GGC	GGC	CTG	TGC	CAC	CTG	GTC	TTC	TTC	CTG	CAG	GCG	GTC	ACC
	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Val	Phe	Phe	Leu	Gln	Ala	Val	Thr
	225					234			243			252			261			270
	GTC	TAT	GTG	TCG	GTG	TTC	ACG	CTC	ACC	ACC	ATC	GCA	GTG	GAC	CGC	TAC	GTC	GTG
	Val	Tyr	Val	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Thr	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Val
	279					288			297			306			315			324
	CTG	GTG	CAC	CCG	CTG	AGG	CCG	CGC	ATC	TCG	CTG	CGC	CTC	AGC	GCC	TAC	GCT	GTG
	Leu	Val	His	Pro	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Val
	333					342			351			360			369			378
	CTG	GCC	ATC	TGG	GTG	CTG	TCC	GCG	GTG	CTG	GCG	CTG	CCC	GCC	GCC	GTG	CAC	ACC
	Leu	Ala	Ile	Trp	Val	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	His	Thr
	387					396			405			414			423			432
	TAT	CAC	GTG	GAG	CTC	AAG	CCG	CAC	GAC	GTG	CGC	CTC	TGC	GAG	GAG	TTC	TGG	GGC
	Tyr	His	Val	Glu	Leu	Lys	Pro	His	Asp	Val	Arg	Leu	Cys	Glu	Glu	Phe	Trp	Gly
	441					450			459			468			477			486
	TCC	CAG	GAG	CGC	CAG	CGC	CAG	CTC	TAC	GCC	TGG	GGG	CTG	CTG	CTG	GTC	ACC	TAC
	Ser	Gln	Glu	Arg	Gln	Arg	Gln	Leu	Tyr	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Tyr
	495					504			513			522			531			540
	CTG	CTC	CCT	CTG	CTG	GTC	ATC	CTC	CTG	TCT	TAC	GCC	CGG	GTG	TCA	GTG	AAG	CTC
	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Ser	Tyr	Ala	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu
	549					558			567			576			585			594
	CGC	AAC	CGC	GTG	GTG	CCG	GGC	CGC	GTG	ACC	CAG	AGC	CAG	GCC	GAC	TGG	GAC	CGC
	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Val	Thr	Gln	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg
	603					612			621			630			639			648
	GCT	CGG	CGC	CGG	CGC	ACC	TTC	TGC	TTC	CTG	GTG	GTG	GTC	GTG	GTG	GTC	TTC	ACC
	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Phe	Thr
	657					666												
	CTC	TGC	TGG	CTG	CCC	TTC	TTC	3'										
	Leu	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Phe											

【図7】

p19P2	1	10	20	30	40	50
pg3-2/pg1-10	1	VGWVGNVLLV	LVIAVRRLH	NVTFNLGNL	ALSDVFNCTA	CVPLTTLAYAF
	1	VGWVGNVLLV	LVIAVRRLY	NVTFNLGNL	ALSDVFNCTA	CVPLTTLAYAF
p19P2	51	60	70	80	90	100
pg3-2/pg1-10	51	EPRGVVEGGG	LCHLVFFLQP	VTVVVSFTL	TTIAVDRYVV	LVHPLRRRI-
	51	EPRGVVEGGG	LCHLVFFLQA	VTVVVSFTL	TTIAVDRYVV	LVHPLRRRIS
p19P2	101	110	120	130	140	150
pg3-2/pg1-10	101	LRLSAYAVLA	IWLSAVLAL	PAAVHTYHVE	LKPHDVRCLCE	EFWGSQERQR
p19P2	151	160	170	180	190	200
pg3-2/pg1-10	151	QLYAWGLLLV	TYLLPPLLVL	LSYVRVSVKL	RNRVVEGCVT	QSQADWDRAK
	201	RRRTFCLLVV	VWVFAICWL	PYY.....	.....	.....
pg3-2/pg1-10	201	RRRTFCLLVV	VWVFEILCWL	EFF.....	.....	.....



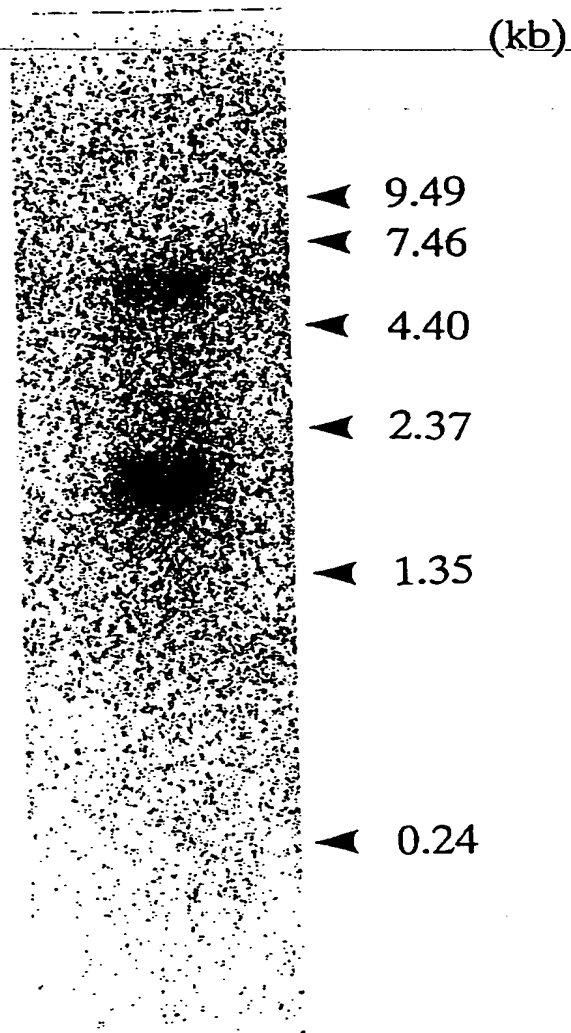
【図8】



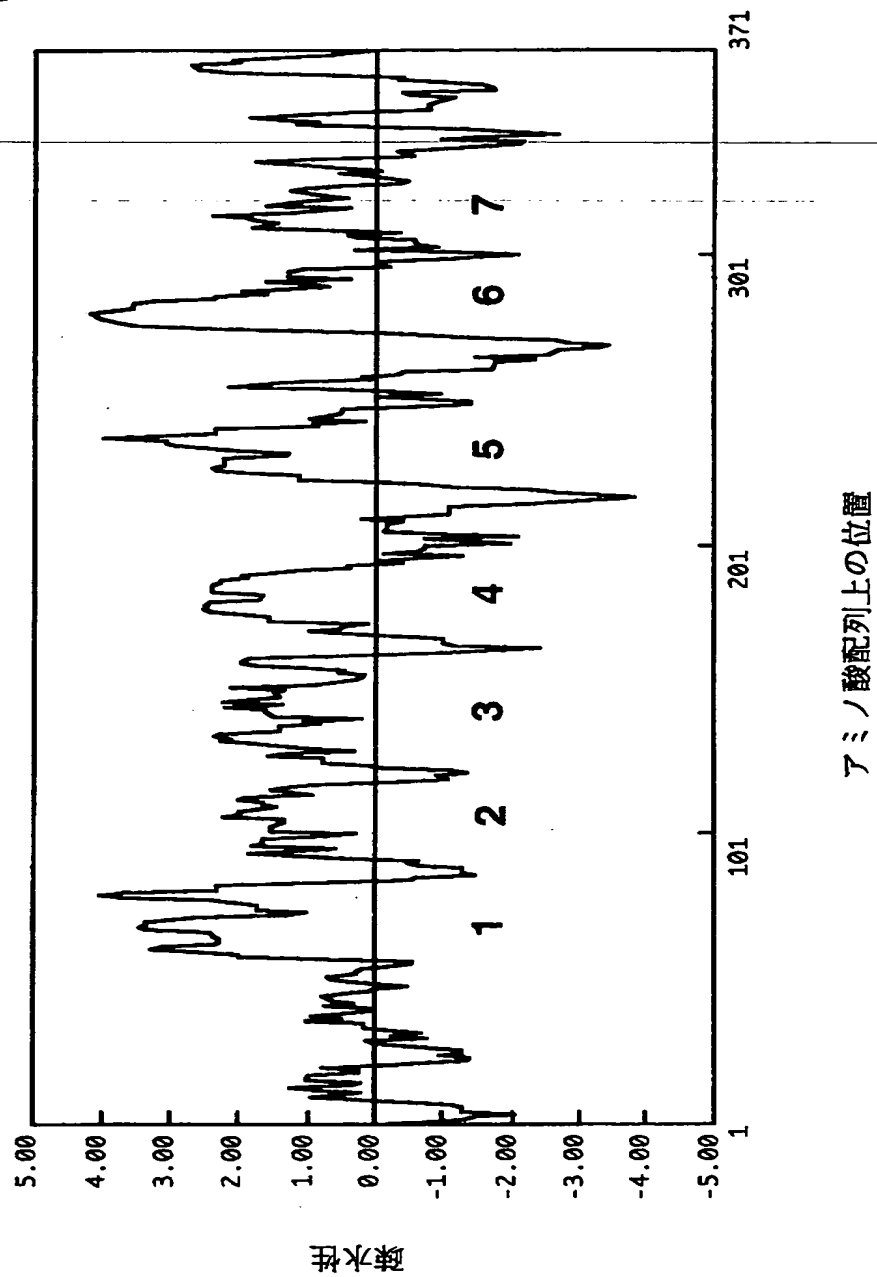
【图9】

1	CATCGTCAAGCAGATGAAGATCATCCACGAGGATGGCTACTCCGAGGGCCAGCAGAAATT	60
1		1
61	CTGCCCCCTTCTTCCCGCGAGTGCTTTCCTCGCTCTCCAAACCCCACTCCAGGTGGCCATG	120
1	Met	1
121	GCCTCATCGACCACTCGGGGCCCCAGGGTTTCTGACTTATTTTCTGGGCTGCCGCGGGCG	180
1	AlaSerSerThrThrArgGlyProArgValSerAspLeuPheSerGlyLeuProProAla	21
181	GTCACAACCTCCGCCAACCAGAGCGCAGAGGCTCGGCGGGCAACGGTGGGTGGCTGGC	240
21	ValThrThrProAlaAsnGlnSerAlaGluAlaSerAlaGlyAsnGlySerValAlaGly	41
241	GCGGACGCTCCAGCCGTCACGCCCTTCCAGAGCCTGCAGCTGGTGCATCAGCTGAAGGGG	300
41	AlaAspAlaProAlaValThrProPheGlnSerLeuGlnLeuValHisGlnLeuLysGly	61
301	CTGATCGTGTCTGTCTACAGCGTCTGGTGGTGGTGGGGCTGGTGGGCAACTGCCTGCTG	360
61	LeuIleValLeuLeuTyrSerValValValValValGlyLeuValGlyAsnCysLeuLeu	81
361	GTGCTGGTGATCGCGGGGTGCGCGGGCTGCACAACGTGACGAACCTTCCTCATCGGCAAC	420
81	ValLeuValIleAlaArgValArgArgLeuHisAsnValThrAsnPheLeuIleGlyAsn	101
421	CTGGCCTTGTCCGACGTGCTCATGTGCACCGCCTGCGTGCGCTCAGCTGGCCTATGCC	480
101	LeuAlaLeuSerAspValLeuMetCysThrAlaCysValProLeuThrLeuAlaTyrAla	121
481	TTGAGCCACGCGGCTGGGTGTTCGGCGGGCGGCTGTGCCACCTGGTCTTCTTCCTGCAG	540
121	PheGluProArgGlyTrpValPheGlyGlyGlyLeuCysHisLeuValPhePheLeuGln	141
541	CCGTCACCGTCTATGTGTGGTGTTCACGCTCACCACCATCGCAGTGGACCGCTACGTC	600
141	ProValThrValTyrValSerValPheThrLeuThrThrIleAlaValAspArgTyrVal	161
501	GTGCTGGTGCACCCGCTGAGGCGGCGCATCTCGCTGCGCCTCAGCGCTACGCTGTGCTG	660
161	ValLeuValHisProLeuArgArgIleSerLeuArgLeuSerAlaTyrAlaValLeu	181
561	GCCATCTGGGCGCTGTCCGCGGTGCTGGCGCTGCCCGCCGCGTGCACACCTATCAGTG	720
181	AlaIleTrpAlaLeuSerAlaValLeuAlaLeuProAlaAlaValHisThrTyrHisVal	201
721	GAGCTCAAGCCGACGACGTCGCCCTCTGCGAGGAGTTCTGGGGCTCCAGGAGCGCCAG	780
201	GluLeuLysProHisAspValArgLeuCysGluGluPheTrpGlySerGlnGluArgGln	221
781	CGCCAGCTCTACGCCTGGGGCTGCTGCTGGTACCTACCTGCTCCCTCTGCTGGTCATC	840
221	ArgGlnLeuTyrAlaTrpGlyLeuLeuLeuValThrTyrLeuLeuProLeuLeuValIle	241
841	CTCTGTCTTACGTCCGGGTGTCACTGAAGCTCCGCAACCGGTGGTGCAGGGCTGCGTG	900
241	LeuLeuSerTyrValArgValSerValLysLeuArgAsnArgValValProGlyCysVal	261
901	ACCCAGAGCCAGGCGACTGGGACCGCGCTCGGCGCCGGCGCACCTTCGCTTGCTGGTG	960
261	ThrGlnSerGlnAlaAspTrpAspArgAlaArgArgArgThrPheCysLeuLeuVal	281
961	GTGGTCGTGGTGGTGTTCGCCGTCTGCTGGCTGCCGCTGCACGCTTCAACCTGCTGCGG	1020
281	ValValValValValPheAlaValCysTrpLeuProLeuHisValPheAsnLeuLeuArg	301
1021	GACCTCGACCCCCACGCCATCGACCCTTACGCCCTTGGGGCTGGTGCAGCTGCTCTGCCAC	1080
301	AspLeuAspProHisAlaIleAspProTyrAlaPheGlyLeuValGlnLeuLeuCysHis	321
1081	TGGCTCGCCATGAGTTCGGCCTGTACAAACCCCTTCATCTACGCCTGGCTGCACGACAGC	1140
321	TrpLeuAlaMetSerSerAlaCysTyrAsnProPheIleTyrAlaTrpLeuHisAspSer	341
1141	TTCCGCGAGGAGCTGCCCAAACCTGTTGGTTCGCTTGGCCCCGCAAGATAGCCCCCATGGC	1200
341	PheArgGluGluLeuArgLysLeuLeuValAlaTrpProArgLysIleAlaProHisGly	361
1201	CAGAATATGACCGTCAGCGTGGTCACTGTATGCCACTTAGCCAGGCCTTGGTCAAGGAGC	1260
361	GlnAsnMetThrValSerValValIle***	371
1261	TCCACTTCAACTGGCCTCCTAGGGCACCCTCGAGGTCAATCTGGTGCCTTATTCTCAGCA	1320
371		371
1321	CCAGAGCTAGC	1331
371		371

【図10】



【図11】



【図12】

5'	CTG	TGT	GTC	ATC	GCG	GTG	GAT	AGG	TAC	GTG	GTT	CTG	GTG	CAC	CCG	CTA	CGT	CGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Leu	Cys	Val	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Val	Leu	Val	His	Pro	Leu	Arg	Arg
	63					72				81			90			99		108
	CGC	ATT	TCA	CTG	AGG	CTC	AGC	GCC	TAC	GCG	GTG	CTG	GGC	ATC	TGG	GCT	CTA	TCT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Val	Leu	Gly	Ile	Trp	Ala	Leu	Ser
	117					126				135			144			153		162
	GCA	GTG	CTG	GCG	CTG	CCG	GCC	GCG	GTG	CAC	ACC	TAC	CAT	GTG	GAG	CTC	AAG	CCC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	His	Thr	Tyr	His	Val	Glu	Leu	Lys	Pro
	171					180				189			198			207		216
	CAC	GAC	GTG	AGC	CTC	TGC	GAG	GAG	TTC	TGG	GGC	TCG	CAG	GAG	CGC	CAA	CGC	CAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	His	Asp	Val	Ser	Leu	Cys	Glu	Glu	Phe	Trp	Gly	Ser	Gln	Glu	Arg	Gln	Arg	Gln
	225					234				243			252			261		270
	ATC	TAC	GCC	TGG	GGG	CTG	CTT	CTG	GGC	ACC	TAT	TTG	CTC	CCC	CTG	CTG	GCC	ATC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ile	Tyr	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ile
	279					288				297			306			315		324
	CTC	CTG	TCT	TAC	GTA	CGG	GTG	TCA	GTG	AAG	CTG	AGG	AAC	CGC	GTG	GTG	CCT	GGC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Leu	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly
	333					342				351			360			369		378
	AGC	GTG	ACC	CAG	AGT	CAA	GCT	GAC	TGG	GAC	CGA	GCG	CGT	CGC	CGC	CGC	ACT	TTC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Ser	Val	Thr	Gln	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe
	387					396				405			414			423		432
	TGT	CTG	CTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTA	GTG	TTC	ACG	CTC	TGC	TGG	CTG	CCC	TTC	TAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Phe	Thr	Leu	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Tyr

CT 3'

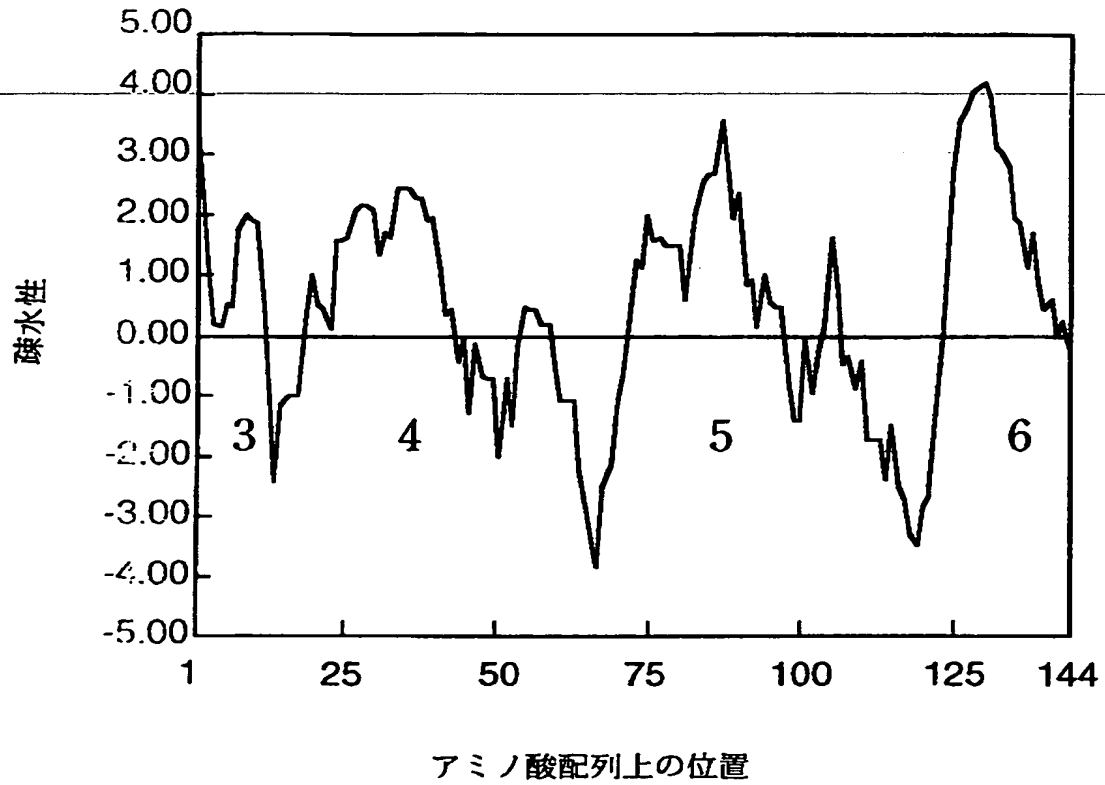
---

---

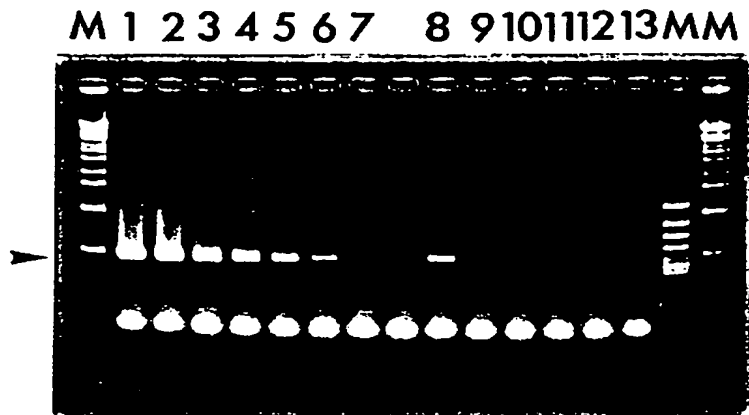
【図13】

p19P2	1	VGMVGNVLLV	10	LVIARVRRRH	20	NVTNFIIGNI	30	ALSDVLMCTA	40	CVPLTLAYAF	50
pG3-2/pg1-10	1	VGMVGNVLLV		LVIARVRRRL		NVTNFIIGNI		ALSDVLMCTA		CVPLTLAYAF	50
p5S38	-79										-30
p19P2	51	EPRGAVFGGG	60	LCHLVFFLQP	70	VTVVVSFTL	80	TTIAVDRYVV	90	LVHPLRRRI	100
pG3-2/pg1-10	51	EPRGAVFGGG		LCHLVFFLOA		VTVVVSFTL		TTIAVDRYVV		LVHPLRRRI	100
p5S38	-29							CVIAVDRYVV		LVHPLRRRI	21
p19P2	101		110		120		130		140		150
pG3-2/pg1-10	101	LRLSAYAVLA		IMVLSAVLAL		PAAVHTYHVE		LKPHDVRICE		EFWGSQERQR	150
p5S38	22	LRLSAYAVLG		IMVLSAVLAL		PAAVHTYHVE		LKPHDVSICE		EFWGSQERQR	71
p19P2	151	-----GLLLV	160	TYLLPLLVIL	170	LSYVRVSVKL	180	RNRVVEGCVT	190	QSQADWDRAR	200
pG3-2/pg1-10	151	QIYAMGLLLV		TYLLPLLVIL		LSYVRVSVKL		RNRVVEGCVT		QSQADWDRAR	200
p5S38	72	QIYAMGLLLG		TYLLPLLAAL		LSYVRVSVKL		RNRVVEGCVT		QSQADWDRAR	121
p19P2	201	RRRTFCILLV	210	VWVFALCWL	220	PVY	230		240		250
pG3-2/pg1-10	201	RRRTFCILLV		VWVFALCWL		PFF					250
p5S38	122	RRRTFCILLV		VWVFALCWL		PFY					171

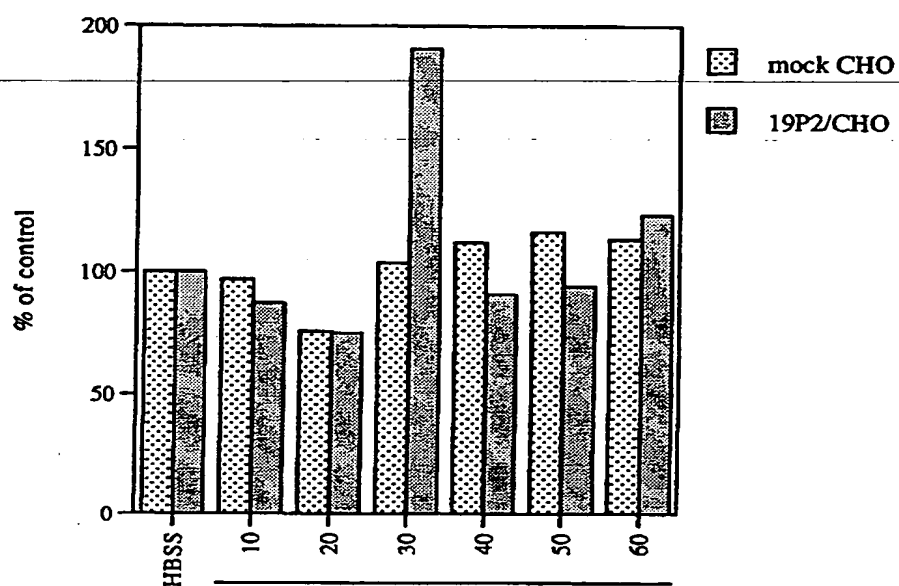
【図14】



【図15】



【図16】

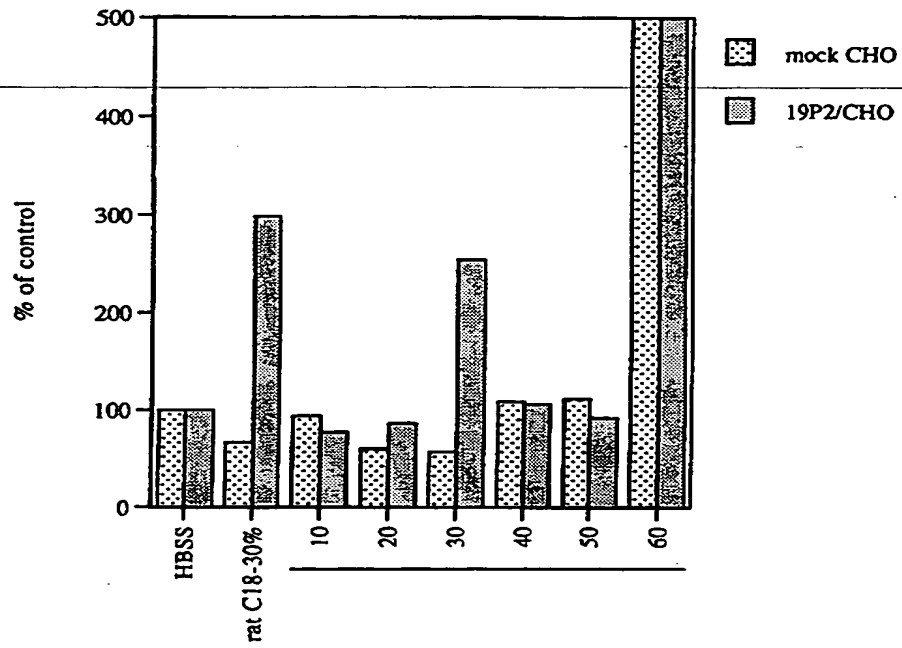


ラット全脳抽出液

C<sub>18</sub>-カラム溶出アセトニトリル濃度 (%)



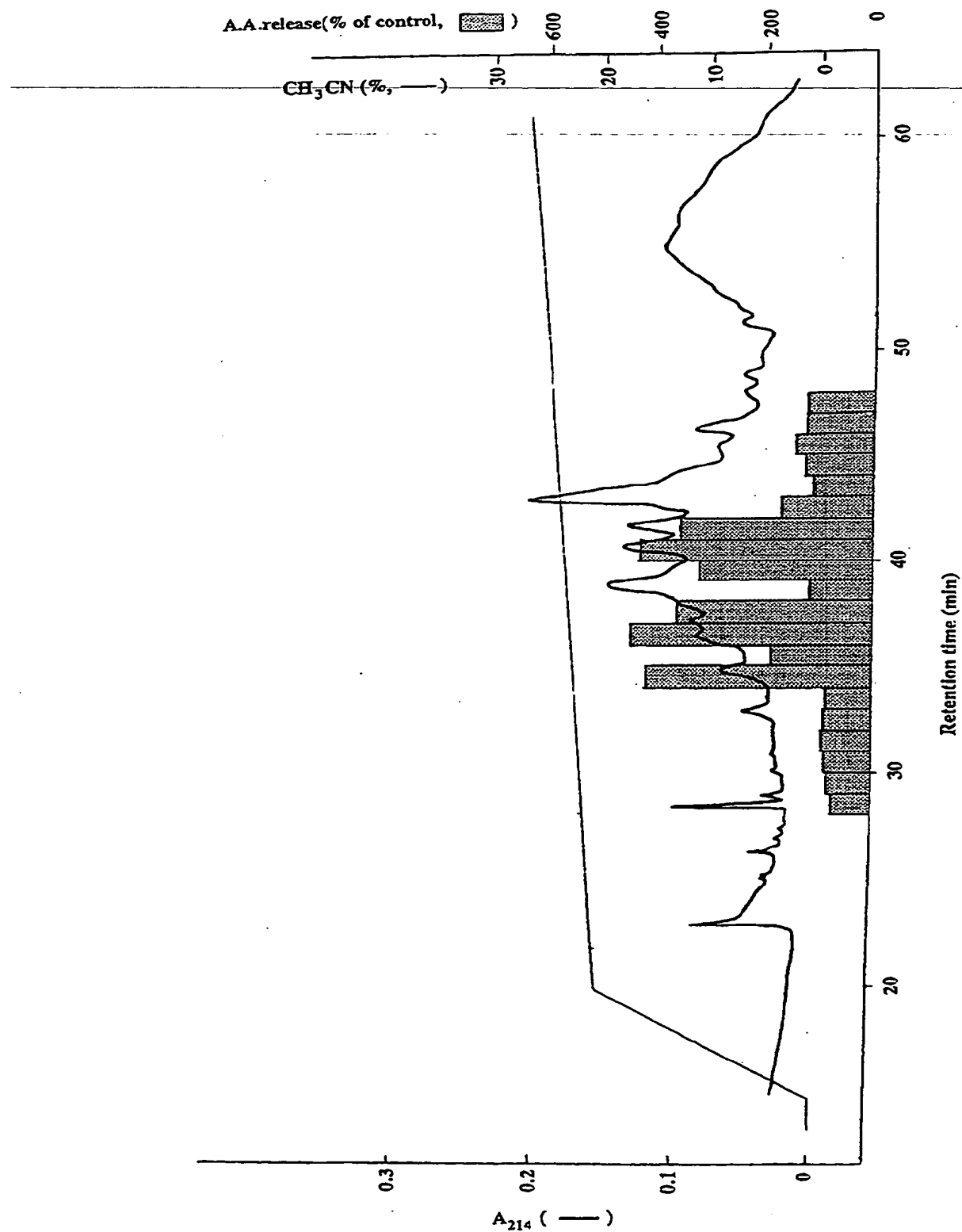
【図17】



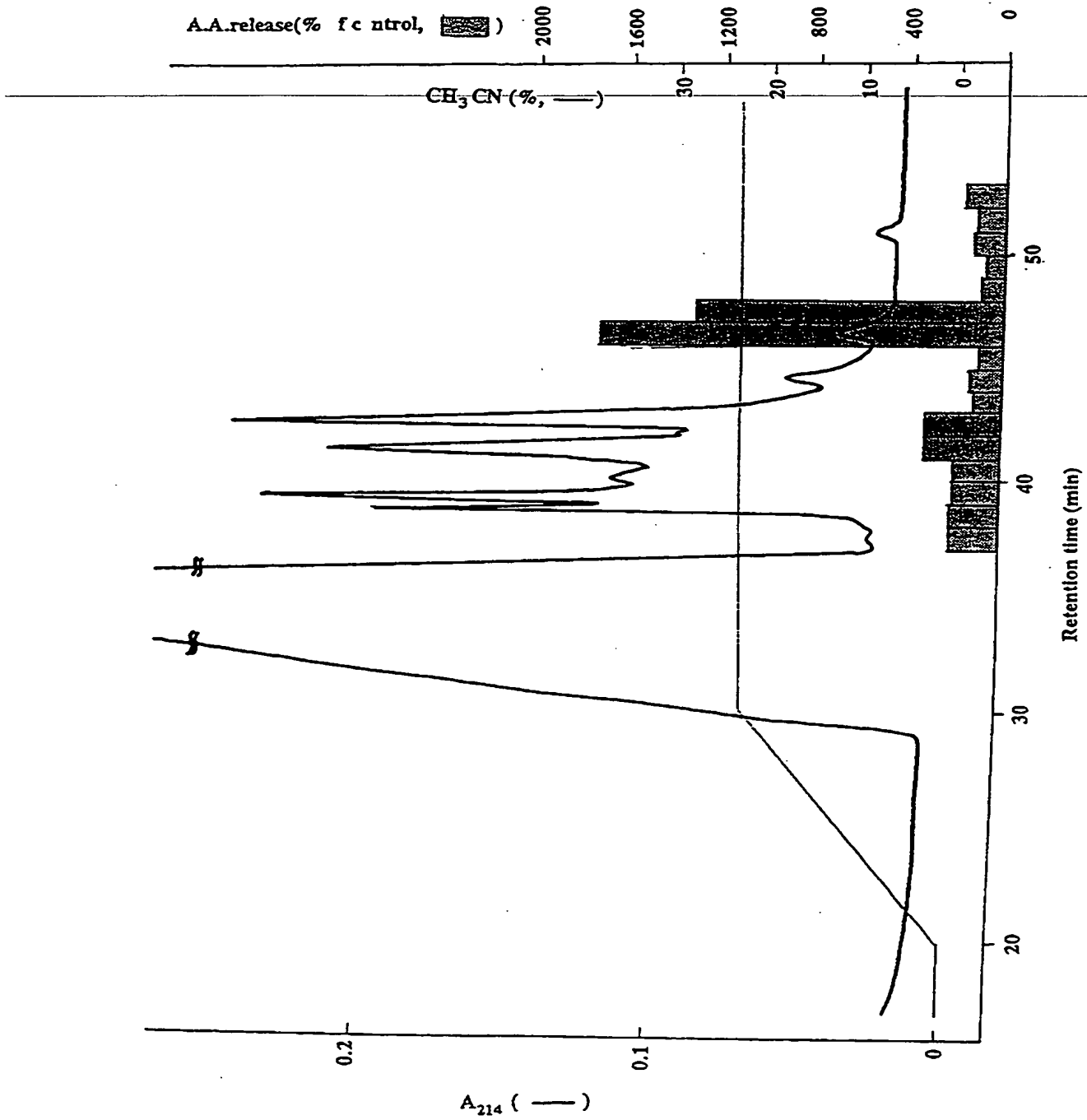
ウシ視床下部抽出液

C<sub>18</sub>-カラム溶出アセトニトリル濃度 (%)

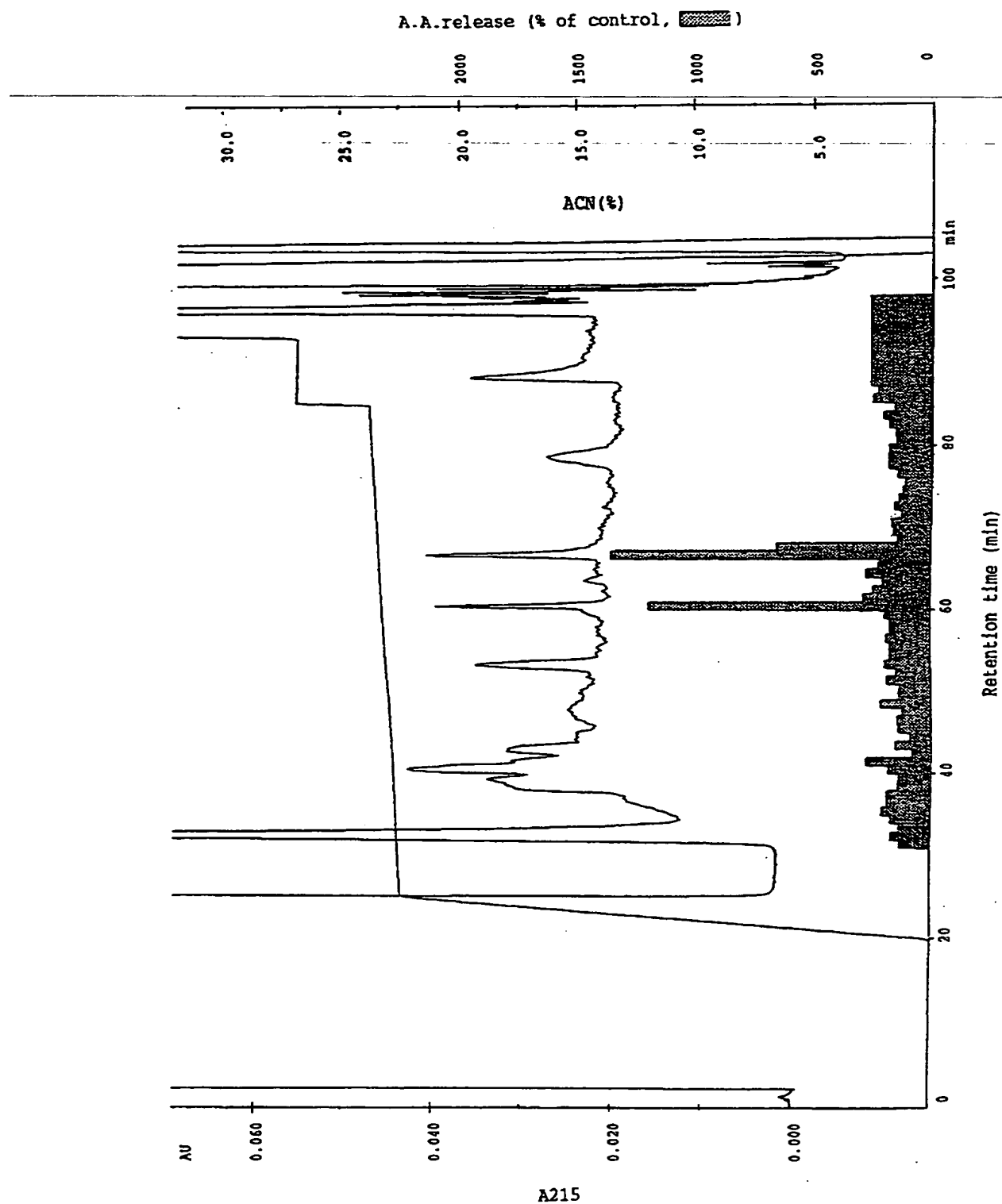
【図18】



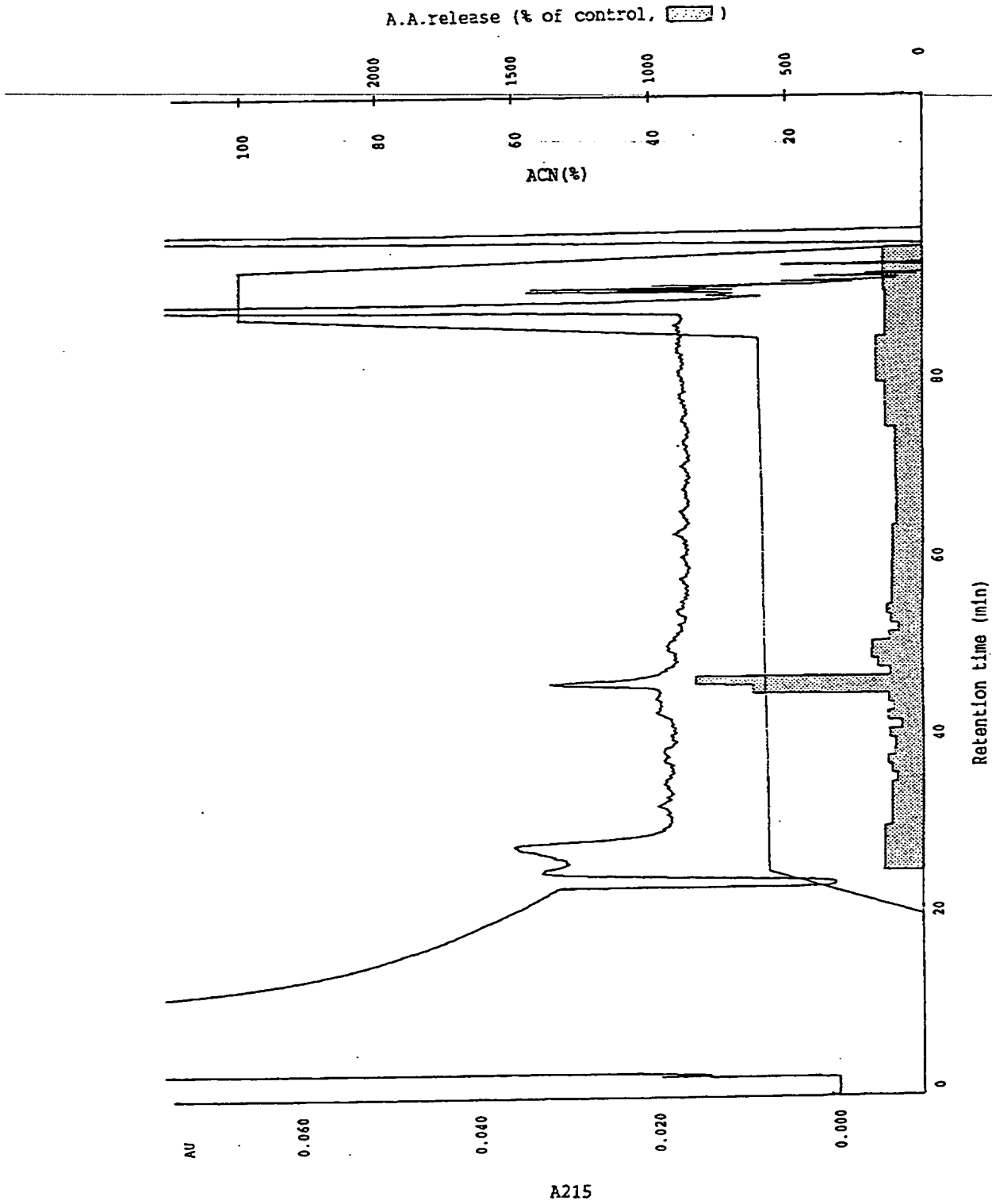
【図19】



【図20】



【図21】



【図22】

P5-1

9 18 27 36 45 54

5' GCC CAC CAG CAC TCC ATG GAG ATC CGC ACC CCC GAC ATC AAC CCT GCC TGG TAC

-----

Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr

-----

63 72

GCG GGC CGT GGG ATC CGG CCC G 3'

-----

Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

P3-2

【図23】

1 GTGGAATGAAGGCGGTGGGGGCTGGCTCCTCTGCCTGCTGCTGCTGGGCCTGGCCCTG 59

1 MetLysAlaValGlyAlaTrpLeuLeuCysLeuLeuLeuLeuGlyLeuAlaLeu 18

60 CAGGGGGCTGCCAGCAGAGCCCACCAGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCGACATCAAC 119

19 GlnGlyAlaAlaSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluIleArgThrProAspIleAsn 38

-----

PDN

120 CCTGCCT 126

39 ProAla 40

【図24】

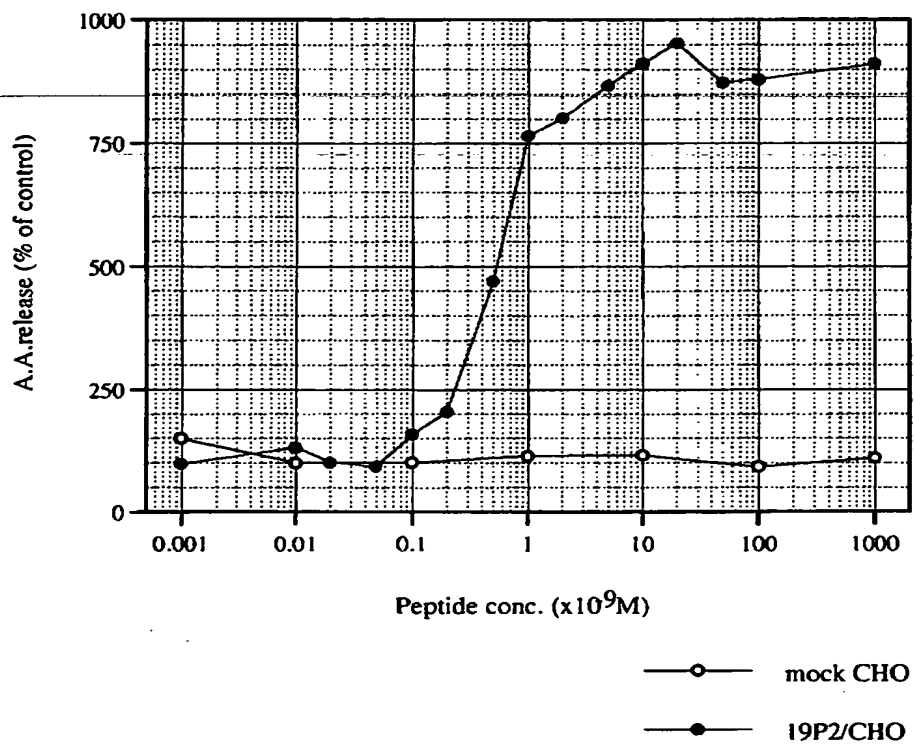
(a)

1	GTGGAATGAAGGCGGTGGGGGCTGGCTCCTCTGCCTGCTGCTGCTGGGGCTGGCCCTG	59
1	MetLysAlaValGlyAlaTrpLeuLeuCysLeuLeuLeuLeuGlyLeuAlaLeu	18
60	CAGGGGGCTGCCAGCAGAGCCCACCAGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCCGACATCAAC	119
19	GlnGlyAlaAlaSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluIleArgThrProAspIleAsn	38
120	CCTGCCTGGTACGCRGGCCGTGGGATCCGGCCCCGTGGGCGCTTCGGCCGGCGAAGAGCT	179
39	ProAlaTrpTyrAlaGlyArgGlyIleArgProValGlyArgPheGlyArgArgArgAla	58
180	GCCCCGGGGGACGGACCCAGGCCTGGCCCCCGGCGTGTGCCGGCCTGCTTCCGCCTGGAA	239
59	AlaProGlyAspGlyProArgProGlyProArgArgValProAlaCysPheArgLeuGlu	78
240	GGCGGYGCTGAGCCCTCCCGAGCCCTCCCGGGGCGGCTGACGGCCCAGCTGGTCCAGGAA	299
79	GlyGlyAlaGluProSerArgAlaLeuProGlyArgLeuThrAlaGlnLeuValGlnGlu	98
300	TAACAGCGGGAGCCTGCCCCCACCCTCCTCCTCCACCAGCCACCTTCCCTCCAGTCCT	359
98		98

(b)

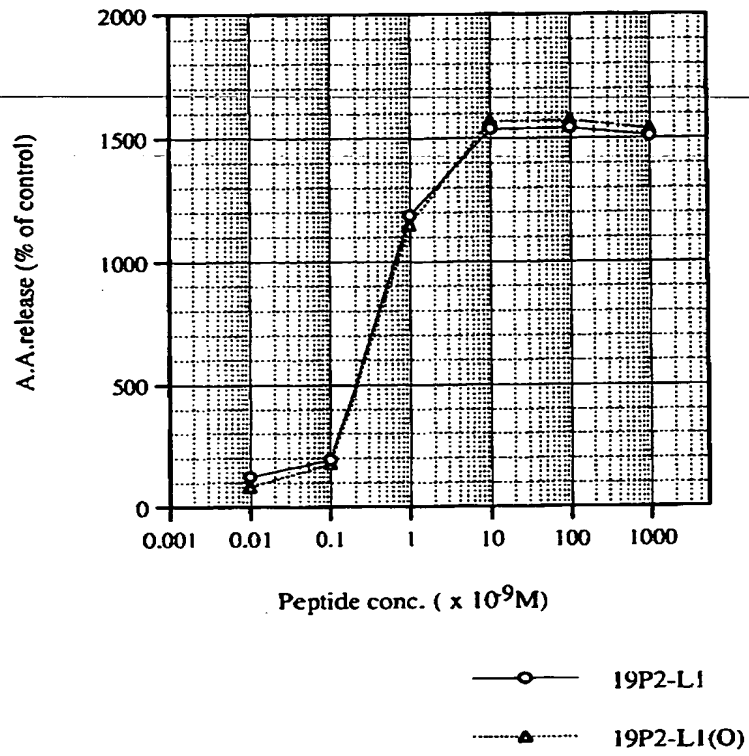
1	GTGGAATGAAGGCGGTGGGGGCTGGCTCCTCTGCCTGCTGCTGCTGGGGCTGGCCCTG	59
1	MetLysAlaValGlyAlaTrpLeuLeuCysLeuLeuLeuLeuGlyLeuAlaLeu	18
60	CAGGGGGCTGCCAGCAGAGCCCACCAGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCCGACATCAAC	119
19	GlnGlyAlaAlaSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluIleArgThrProAspIleAsn	38
120	CCTGCCTGGTACGCRGGCCGTGGGATCCGGCCCCGTGGGCGCTTCGGCCGGCGAAGAGCT	179
39	ProAlaTrpTyrAlaGlyArgGlyIleArgProValGlyArgPheGlyArgArgArgAla	58
180	GCCCTGGGGGACGGACCCAGGCCTGGCCCCCGGCGTGTGCCGGCCTGCTTCCGCCTGGAA	239
59	AlaLeuGlyAspGlyProArgProGlyProArgArgValProAlaCysPheArgLeuGlu	78
240	GGCGGYGCTGAGCCCTCCCGAGCCCTCCCGGGGCGGCTGACGGCCCAGCTGGTCCAGGAA	299
79	GlyGlyAlaGluProSerArgAlaLeuProGlyArgLeuThrAlaGlnLeuValGlnGlu	98
300	TAACAGCGGGAGCCTGCCCCCACCCTCCTCCTCCACCAGCCACCTTCCCTCCAGTCCT	359
98		98
360	AATAAAAGCAGCTGGCTTGTT	380
98		98

【図 25】

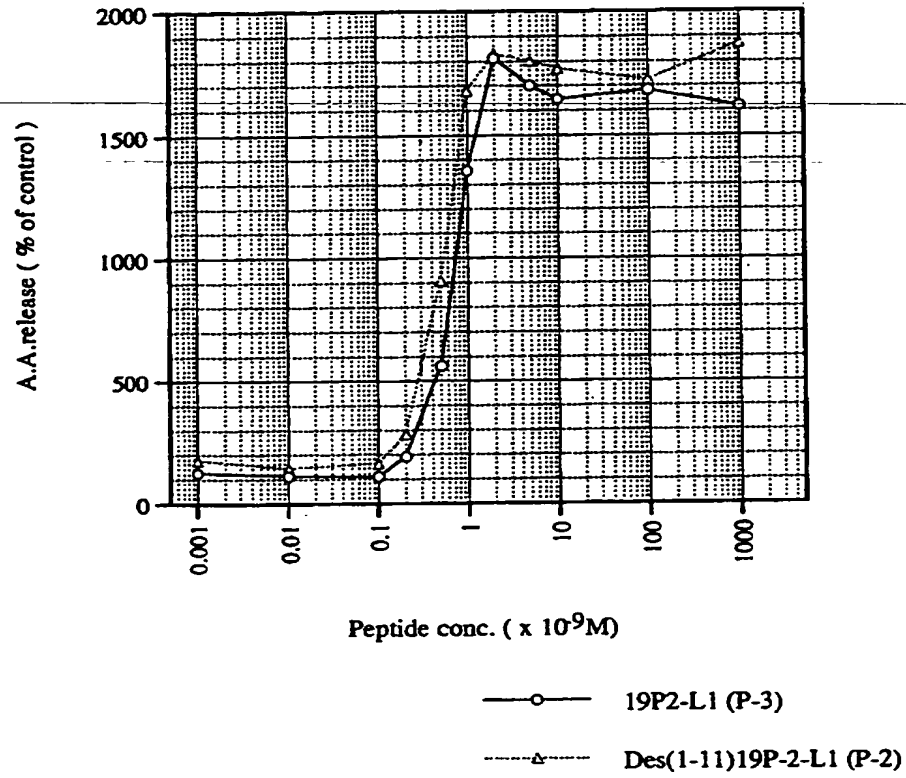




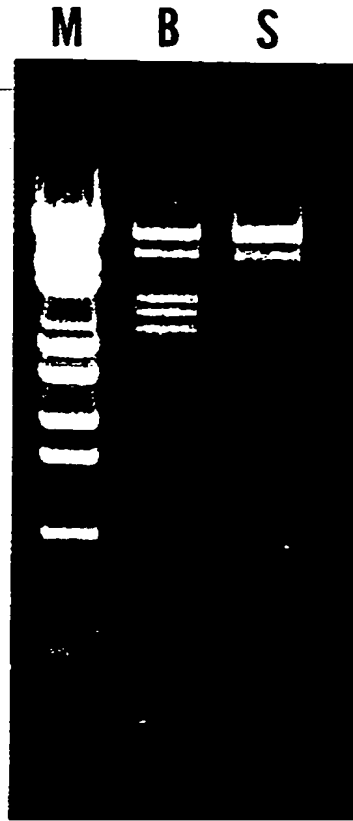
【図 2 6】



【図 27】



【図28】



【図29】

10	20	30	40	50	60
ATGAAGGCGG	TGGGGGCCTG	GCTCCTCTGC	CTGCTGCTGC	TGGGCCTGGC	CCTGCAGGGG
70	80	90	100	110	120
GCTGCCAGCA	GAGCCCACCA	GCACTCCATG	GAGATCCGCA	GTGAGTGTCT	AGCCCCGCCC
130	140	150	160	170	180
CTGCCCCCAG	GGGTCACAGG	GGGGGCCTGG	CCACTTCCTG	GGCTGGGACA	TCCTTGCTAA
190	200	210	220	230	240
GCATCCTGGG	GTTGGGGTTT	GGCCTCCTGT	TCCCCAGACC	CTTCCCCCAG	GTGGCCCCGA
250	260	270	280	290	300
CAGGTGCTCC	CAAGGGTCCC	GGCCCAGCAC	ACGGGGGAGG	GTCACCTCCTC	ACCACACGGG
310	320	330	340	350	360
TGGCCTGGGG	CTGAGTGAC	GTCACCCATG	AGAACGGGGC	TGTGAGGACA	GGAAAGGAAG
370	380	390	400	410	420
GGGAGTGTGT	CCTGGTGTA	GTCTGAAATC	CTACTTCCCA	AAGCCACCCC	AGCACCAGAA
430	440	450	460	470	480
ATGGGCGCTC	CGGGTGAACC	TCCTGTGCGG	GTGGGTGGTC	CTGGCATGGC	CTGGGCGACA
490	500	510	520	530	540
GGCAGCCATG	AGCTGAGCAC	ACACCCGGCC	CGGCCACCAG	GGCTGTATGC	TCCAGGGCAC
550	560	570	580	590	600
AGGCCTCCAT	GCGCTCTTCT	CTCTCTTTCC	AGCCCCCGAC	ATCAACCCTG	CCTGGTACGC
610	620	630	640	650	660
AGGCCGTGGG	ATCCGGCCCCG	TGGGCCGCTT	CGGCCGGCGA	AGAGCTGCCC	TGGGGGACGG
670	680	690	700	710	720
ACCCAGGCCT	GGCCCCCGGC	GTGTGCCCGC	CTGCTTCCGC	CTGGAAGGCG	GTGCTGAGCC
730	740	750	760	770	780
CTCCCGAGCC	CTCCCGGGGC	GGCTGACGGC	CCAGCTGGTC	CAGGAATAA	.....

【図30】

genome	1	10	20	30	40	50	
cDNA	1	ATGAAGGCGG	TGGGGGCTG	GCTCCCTCTG	CTGCTGCTG	TGGGCTTGG	50
	1	ATGAAGGCGG	TGGGGGCTG	GCTCCCTCTG	CTGCTGCTG	TGGGCTTGG	50
genome	51	60	70	80	90	100	
cDNA	51	CTGTCAGGGG	GCTGCCAGCA	GAGGCCAACA	GCACTCCATG	GAGATCCGCA	100
	51	CTGTCAGGGG	GCTGCCAGCA	GAGGCCAACA	GCACTCCATG	GAGATCCGCA	100
genome	101	110	120	130	140	150	
cDNA	101	GTGAGTGTCT	AGCCCCGCC	CTGCCCCCAG	GGGTCACAGG	GGGGGCTTGG	150
	101	-----	-----	-----	-----	-----	150
genome	151	160	170	180	190	200	
cDNA	151	CCACTTCTTG	GGCTGGGACA	TCCTTGCTAA	GCATCCTGGG	GTGTTGGGTTT	200
	151	-----	-----	-----	-----	-----	200
genome	201	210	220	230	240	250	
cDNA	201	GGCCTCCTGT	TCGCCAGACC	CTTCCCCCAG	GTGGGCCGGA	CAGGTGCTCC	250
	201	-----	-----	-----	-----	-----	250
genome	251	260	270	280	290	300	
cDNA	251	CAAGGGTCCC	GGGCCAGCAC	ACGGGGGAGG	GTCACCTCTC	ACCACACGGG	300
	251	-----	-----	-----	-----	-----	300
genome	301	310	320	330	340	350	
cDNA	301	TGGGCTGGGG	CTGAGTGAC	GTCAACCATG	AGAACGGGGC	TGTGAGGACA	350
	301	-----	-----	-----	-----	-----	350
genome	351	360	370	380	390	400	
cDNA	351	GGAAAGGAAG	GGGAGTGTGT	CCTGGTGTGA	GTCTGAAATC	CTACTTCCCA	400
	351	-----	-----	-----	-----	-----	400
genome	401	410	420	430	440	450	
cDNA	401	AAGCCACCCC	AGCACCAGAA	ATGGGCGCTC	CGGGTGAACC	TCCTGTGCGG	450
	401	-----	-----	-----	-----	-----	450
genome	451	460	470	480	490	500	
cDNA	451	GTGGGTGGTC	CTGGCATGGC	CTGGGCGACA	GGCAGCCATG	AGCTGAGCAC	500
	451	-----	-----	-----	-----	-----	500
genome	501	510	520	530	540	550	
cDNA	501	ACACCCGGCC	CGGCCACCAG	GGCTGTATGC	TCCAGGGCAC	AGGCTTCCAT	550
	501	-----	-----	-----	-----	-----	550
genome	551	560	570	580	590	600	
cDNA	551	GCGCTCTTCT	CTCTCTTTCC	AGCCCCCGAC	ATCAACCTTG	CTTGGTACGC	600
	551	-----	-----	-----	-----	-----	600
genome	601	610	620	630	640	650	
cDNA	601	AGGCGGTGGG	ATCCGGGCGG	TGGGCGGCTT	OGGCGGCGGA	AGAGCTGCCC	650
	601	GGGCGGTGGG	ATCCGGGCGG	TGGGCGGCTT	OGGCGGCGGA	AGAGCTGCCC	650
genome	651	660	670	680	690	700	
cDNA	651	TGGGGGAACG	ACCCAGGCCT	GGCCCCCGGC	GTGTGCGGGC	CTGCTTCCGC	700
	651	CGGGGGAACG	ACCCAGGCCT	GGCCCCCGGC	GTGTGCGGGC	CAGCTTCCGC	700
genome	701	710	720	730	740	750	
cDNA	701	CTGGAAGGCG	GTGCTGAGCC	CTCCCGAGCC	CTCCCGGGGC	GGCTGACGGC	750
	701	CTGGAAGGCG	GTGCTGAGCC	CTCCCGAGCC	CTCCCGGGGC	GGCTGACGGC	750
genome	751	760	770	780	790	800	
cDNA	751	CCAGCTGGTC	CAGGAATAA	.....	.....	.....	800
	751	CCAGCTGGTC	CAGGAATAA	.....	.....	.....	800

【図 3 1】

5'	ATG	AAG	GCG	GTG	GGG	GCC	TGG	CTC	CTC	TGC	CTG	CTG	CTG	CTG	GGC	CTG	GCC	CTG	54
	M	K	A	V	G	A	W	L	L	C	L	L	L	L	G	L	A	L	
	CAG	GGG	GCT	GCC	AGC	AGA	GCC	CAC	CAG	CAC	TCC	ATG	GAG	ATC	CGC	ACC	CCC	GAC	108
	Q	G	A	A	S	R	A	H	Q	H	S	M	E	I	R	T	P	D	
	ATC	AAC	CCT	GCC	TGG	TAC	GCA	GGC	CGT	GGG	ATC	CGG	CCC	GTG	GGC	CGC	TTC	GGC	162
	I	N	P	A	W	Y	A	G	R	G	I	R	P	V	G	R	F	G	
	CGG	CGA	AGA	GCT	GCC	CTG	GGG	GAC	GGA	CCC	AGG	CCT	GGC	CCC	CGG	CGT	GTG	CCG	216
	R	R	R	A	A	L	G	D	G	P	R	P	G	P	R	R	V	P	
	GCC	TGC	TTC	CGC	CTG	GAA	GGC	GGT	GCT	GAG	CCC	TCC	CGA	GCC	CTC	CCG	GGG	CCG	270
	A	C	F	R	L	E	G	G	A	E	P	S	R	A	L	P	G	R	
	CTG	ACG	GCC	CAG	CTG	GTC	CAG	GAA	TAA	3'									
	L	T	A	Q	L	V	Q	E	*										

【図 3 2】

1	GGCATCATCCAGGAAGACGGAGCATGGCCCTGAAGACGTGGCTTCTGTGCTTGCTGCTG	59
1	MetAlaLeuLysThrTrpLeuLeuCysLeuLeuLeu	12
60	CTAAGCTTGGTCCTCCCAGGGGCTTCCAGCCGAGCCACCAAGCACTCCATGGAGACAAGA	119
13	LeuSerLeuValLeuProGlyAlaSerSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluThrArg	32
120	ACCCCTGATATCAATCCTGCCTGGTACACGGGCGCGGGATCAGGCCTGTGGGCCGCTTC	179
33	ThrProAspIleAsnProAlaTrpTyrThrGlyArgGlyIleArgProValGlyArgPhe	52
180	GGCAGGAGAAGGGCAACCCCGAGGGATGTCACTGGACTTGGCCAACCTCAGCTGCCTCCCA	239
53	GlyArgArgArgAlaThrProArgAspValThrGlyLeuGlyGlnLeuSerCysLeuPro	72
240	CTGGATGGACGCACCAAGTTCTCTCAGCGTGGATAACACCCCGAGCTCGAGAAGACAGTGC	299
73	LeuAspGlyArgThrLysPheSerGlnArgGly***	83
300	TGCTGAGCCCAAGCCACACTCCCTGTCCCCTGCAGACCCTCCTCTACCCCTCCCTCTCCT	359
83		83
360	CTGCT	364
83		83

出証特平 1 0 - 3 0 6 0 1 5 1

【図 3 4】

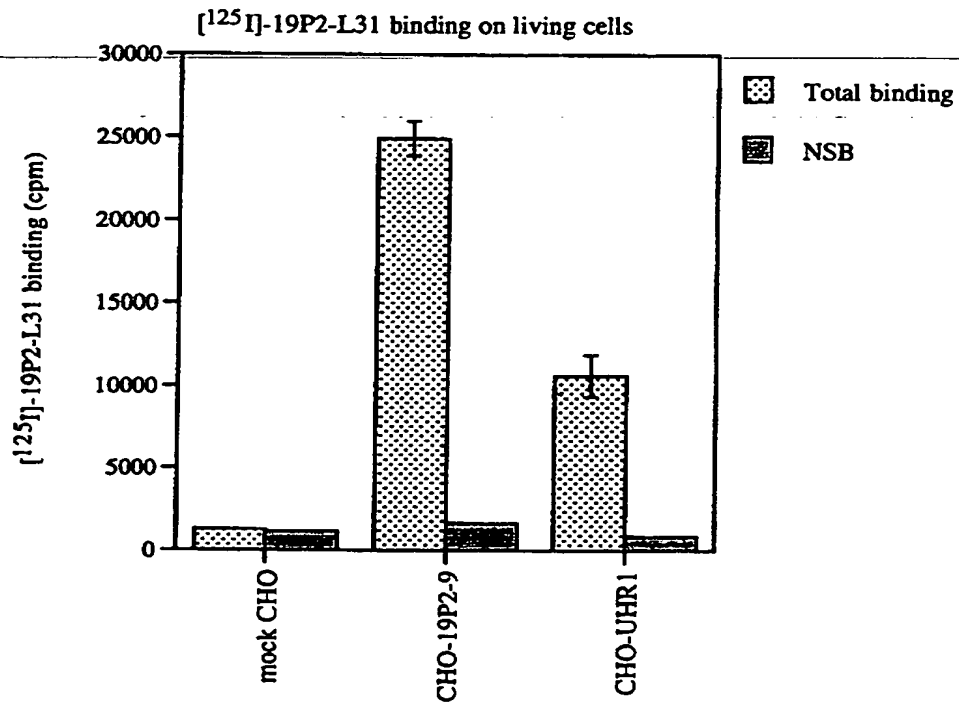
1	GGCCTCCTCGGAGGAGCCAAGGGATGAAGGTGCTGAGGGCCTGGCTCCTGTGCCTGCTG	59
1	MetLysValLeuArgAlaTrpLeuLeuCysLeuLeu	12
60	ATGCTGGGCCTGGCCCTGCGGGGAGCTGCAAGTCGTACCCATCGGCACTCCAATGGAGATC	119
13	MetLeuGlyLeuAlaLeuArgGlyAlaAlaSerArgThrHisArgHisSerMetGluIle	32
120	CGCACCCCTGACATCAATCCTGCCTGGTACGCCAGTCGCGGGATCAGGCCTGTGGGCCGC	179
33	ArgThrProAspIleAsnProAlaTrpTyrAlaSerArgGlyIleArgProValGlyArg	52
180	TTCGGTCGGAGGAGGGCAACCTGGGGGACGTCCCCAAGCCTGGCCTGCGACCCCGGCTG	239
53	PheGlyArgArgArgAlaThrLeuGlyAspValProLysProGlyLeuArgProArgLeu	72
240	ACCTGCTTCCCCCTGGAAGGCGGTGCTATGTCTGTCAGGATGGCTGACAGCCAGCTTGT	299
73	ThrCysPheProLeuGluGlyGlyAlaMetSerSerGlnAspGly***	87
300	CAAGAAACTCACTCTGGAGCCTCCCCACCCACCCCTCTCCTCTCCTTCGGGCTCCTTTC	359
87		87
360	CC	361
87		87

【図 3 5】

		10	20	30	40	50	
bovine.aa	1	MAVGVAVLLC	LLLGATQC	ASSRAHOBSM	ETRTPDINPA	WVAGRGIREV	50
rat.aa	1	M-ALGVAVLLC	LLLGSEVPG	ASSRAHOBSM	ETRTPDINPA	WVTCRGIREV	50
human.aa	1	MAVGVAVLLC	LLLGATQC	ASSRTHRESM	ETRTPDINPA	WVASRGIREV	50
		60	70	80	90	100	
bovine.aa	51	GRFGRRRAAE	GDGERPGPER	VPACERLEGG	DEPSRALPGR	LTAQLVQE*	100
rat.aa	51	GRGGRRAAE	RDVIGLC---	QESCLPLDGR	TKFSORG*	.....	100
human.aa	51	GRGGRRAAE	GDVKEEGLRP	RETCFPLEGG	AMSODG*	.....	100

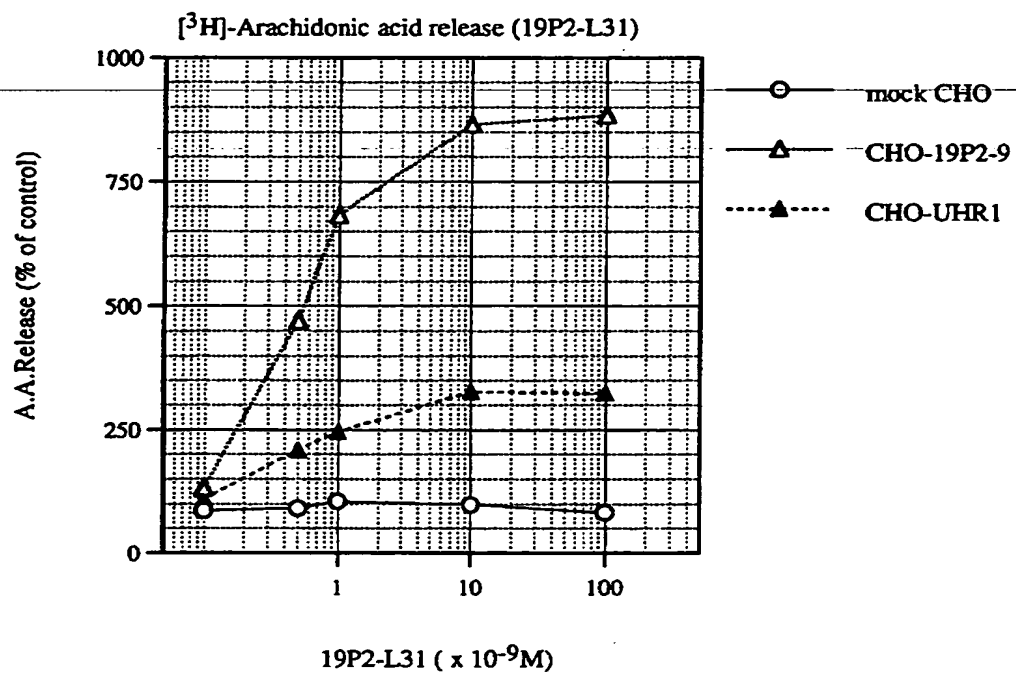


【図 3 6】

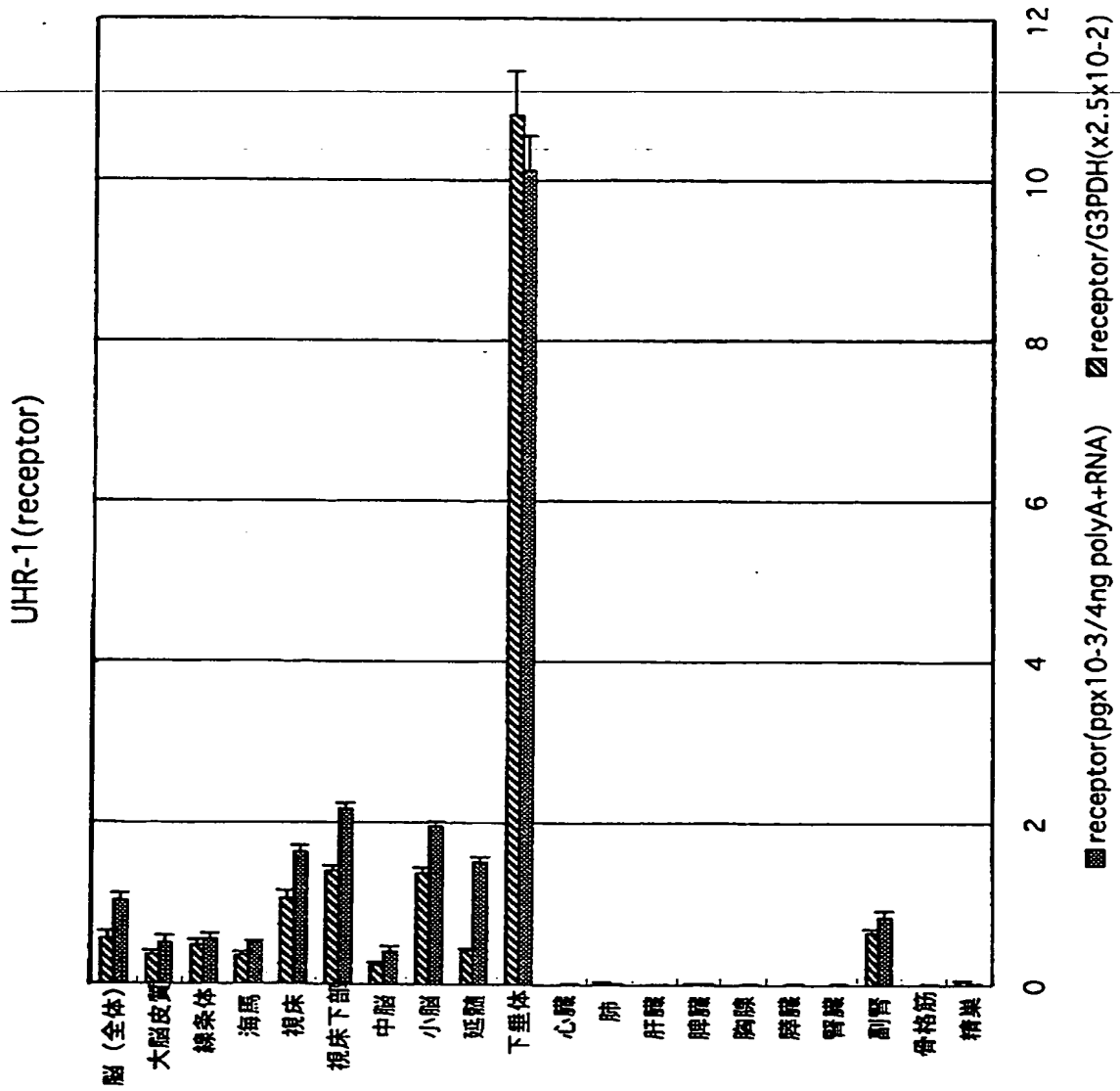


cells;  $0.5 \times 10^7$  cells/ml  
<sup>[125]</sup>I]-19P2-L31; 200pM (avg. 63857.3cpm)  
 NSB; 200nM (x 1,000)  
 reaction; RT, 2.5hr  
 in HBSS + 0.05% BSA + 0.05% CHAPS  
 in 100  $\mu$ l

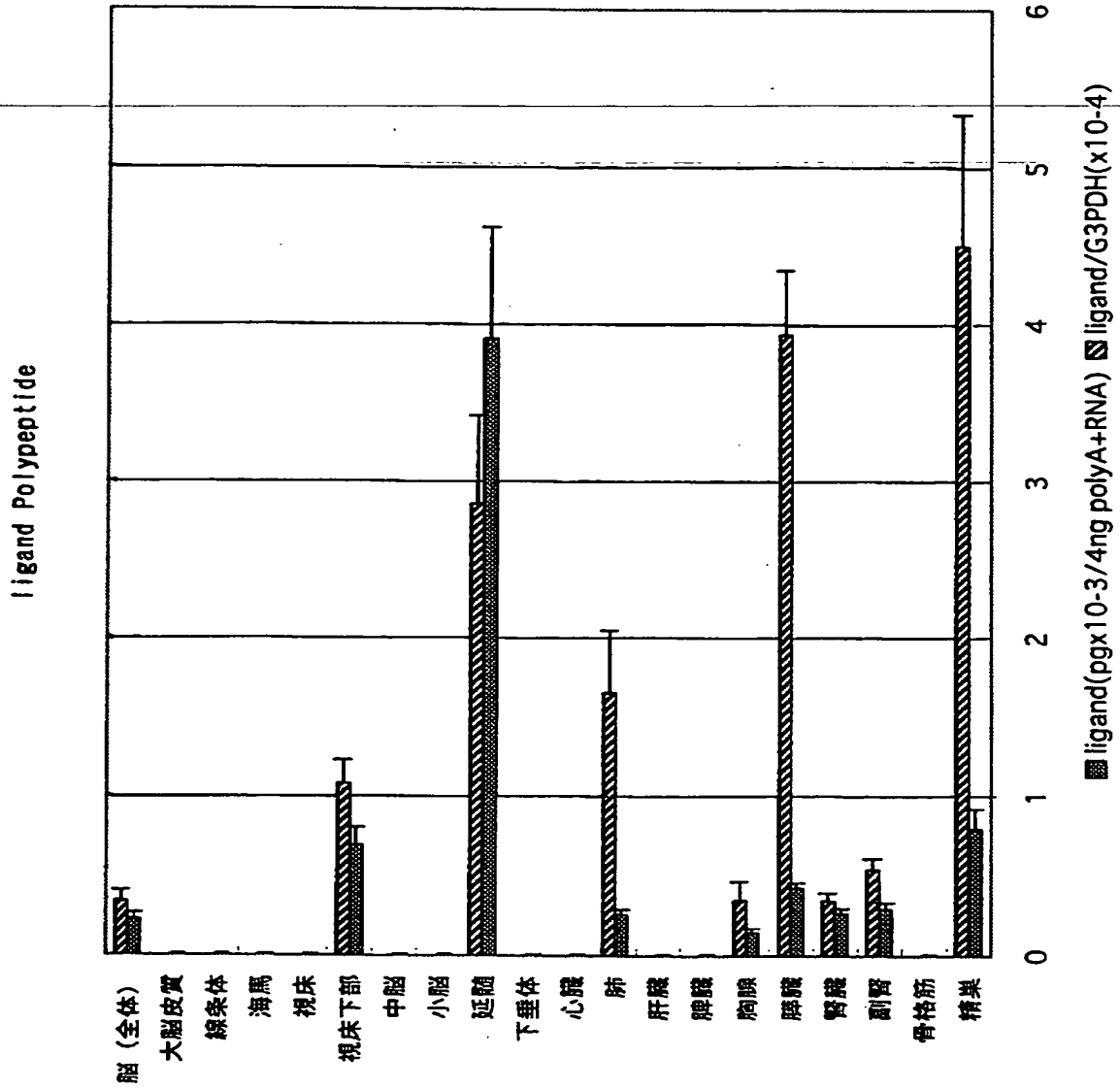
【図 3 7】



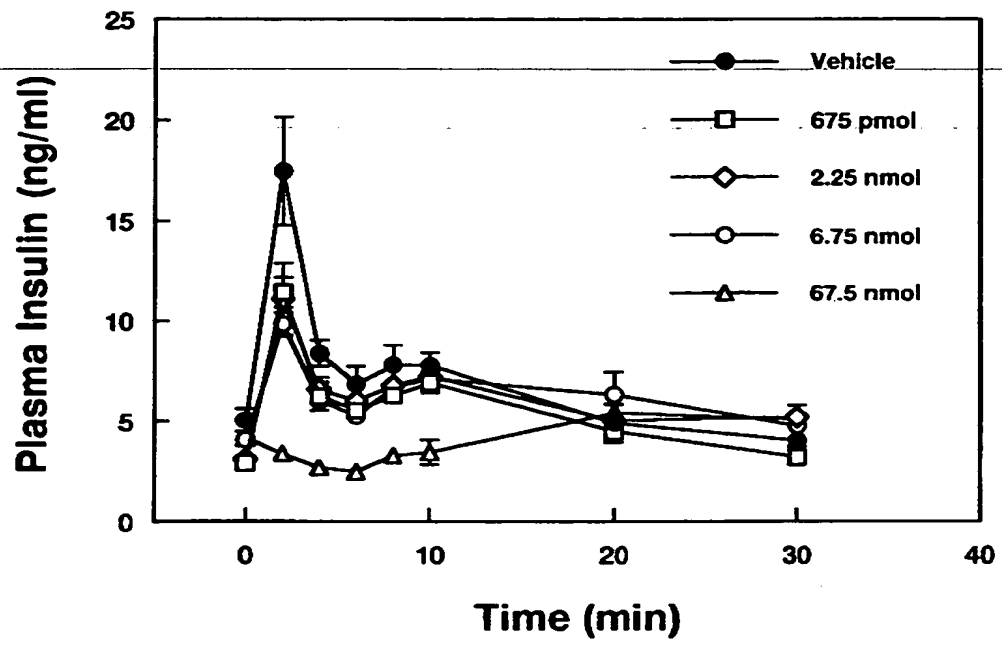
【図 3 8】



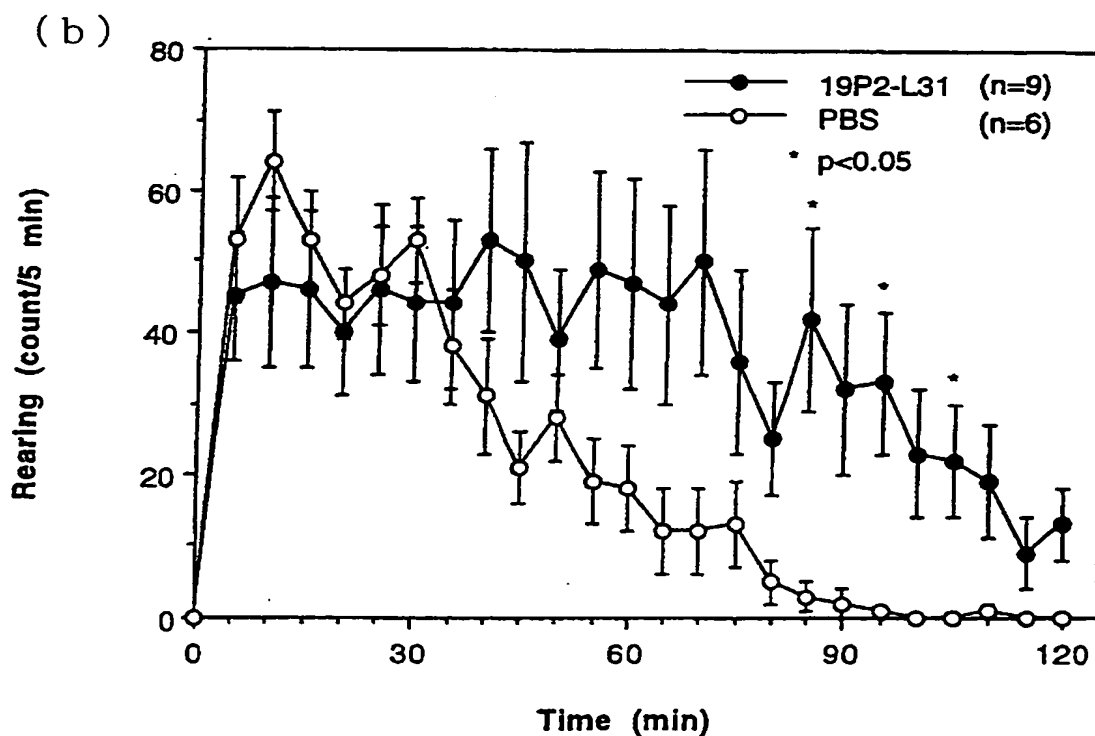
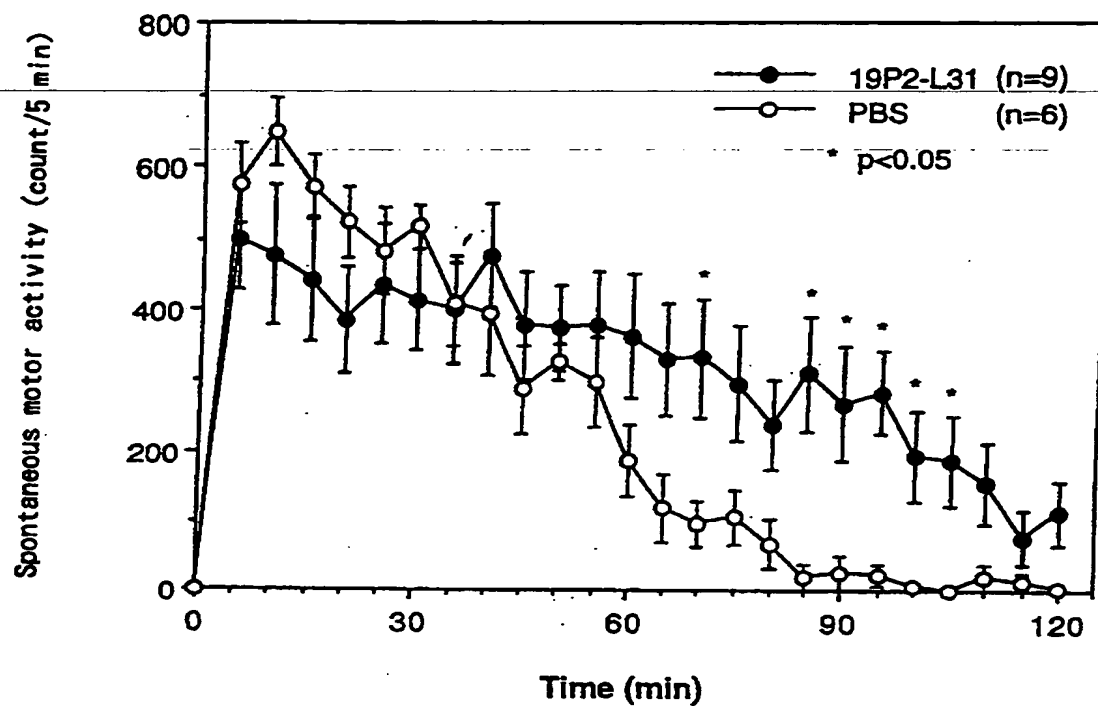
【図39】



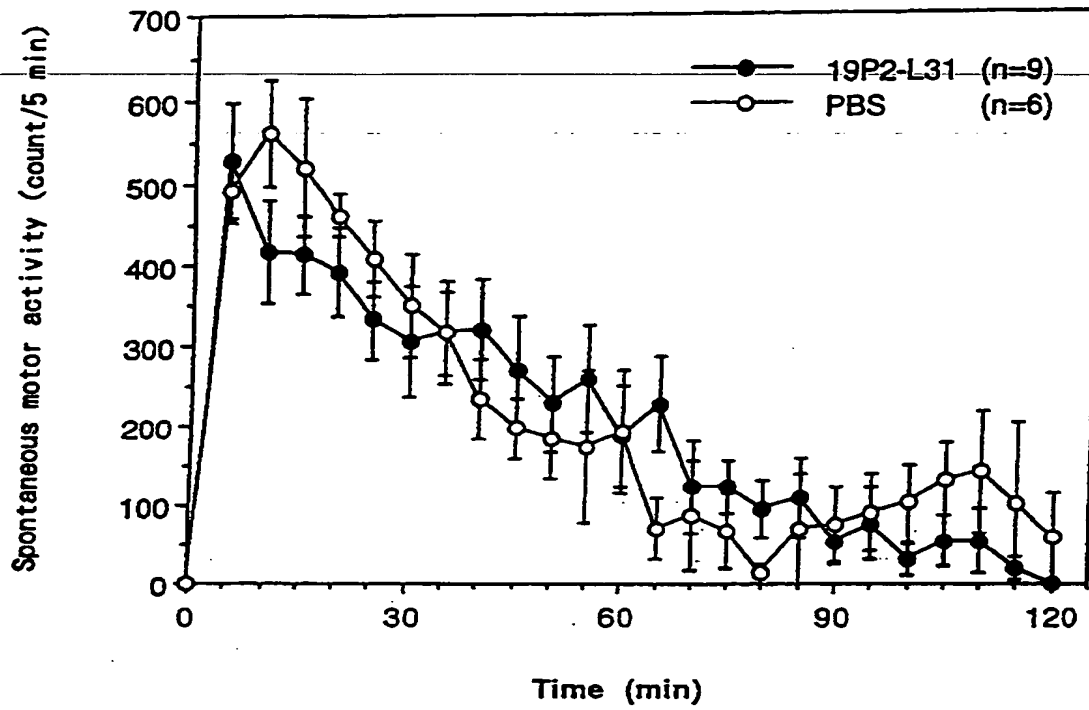
【図 4 0】



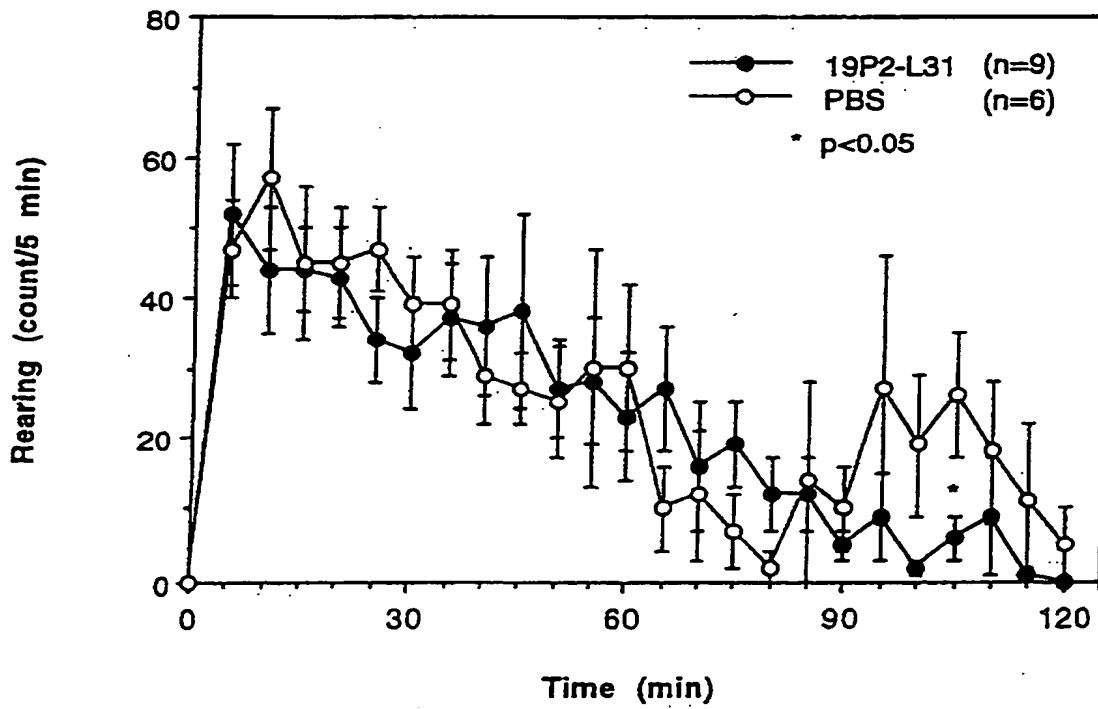
【図4 1】  
(a)



【図42】  
(a)

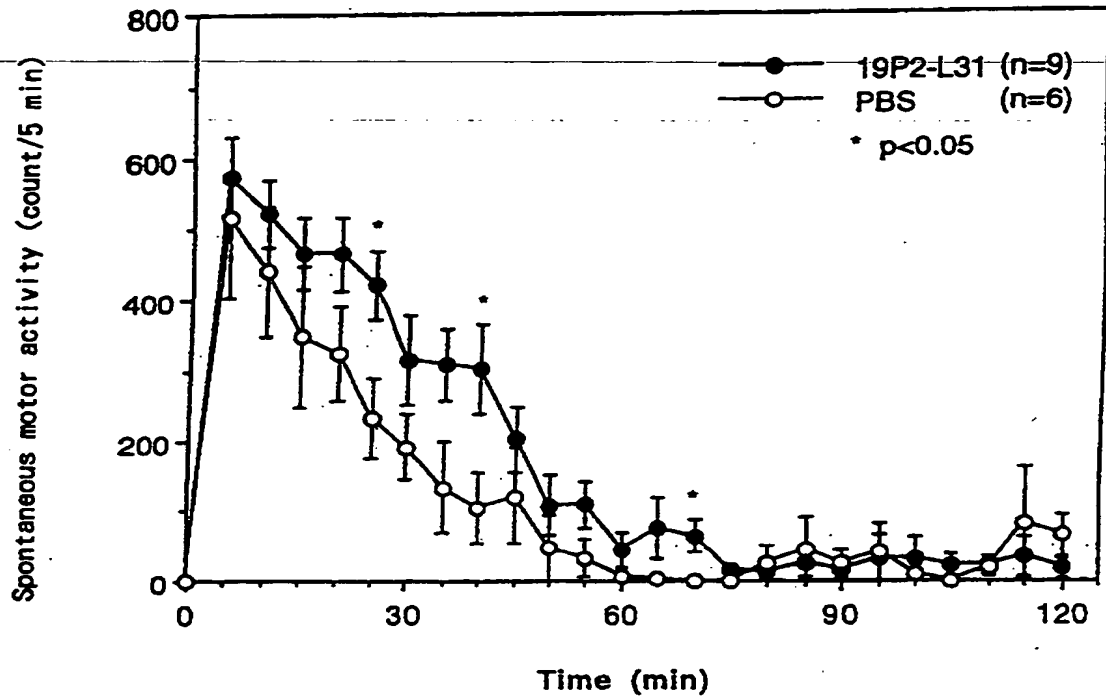


(b)

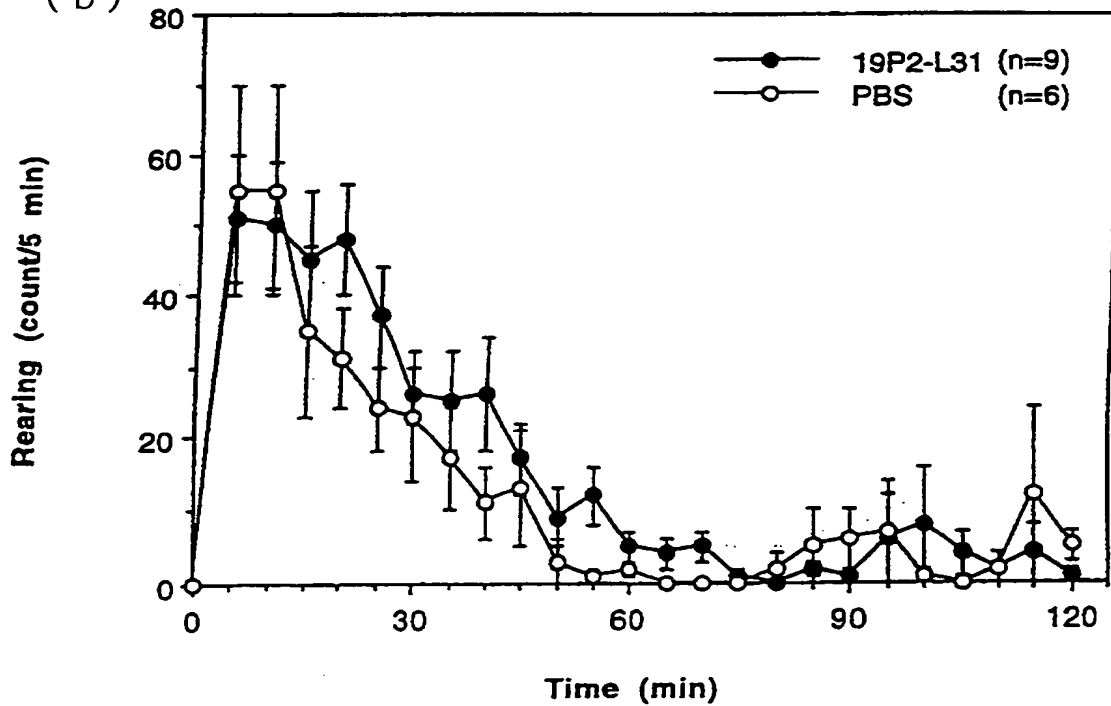


【図43】

(a)



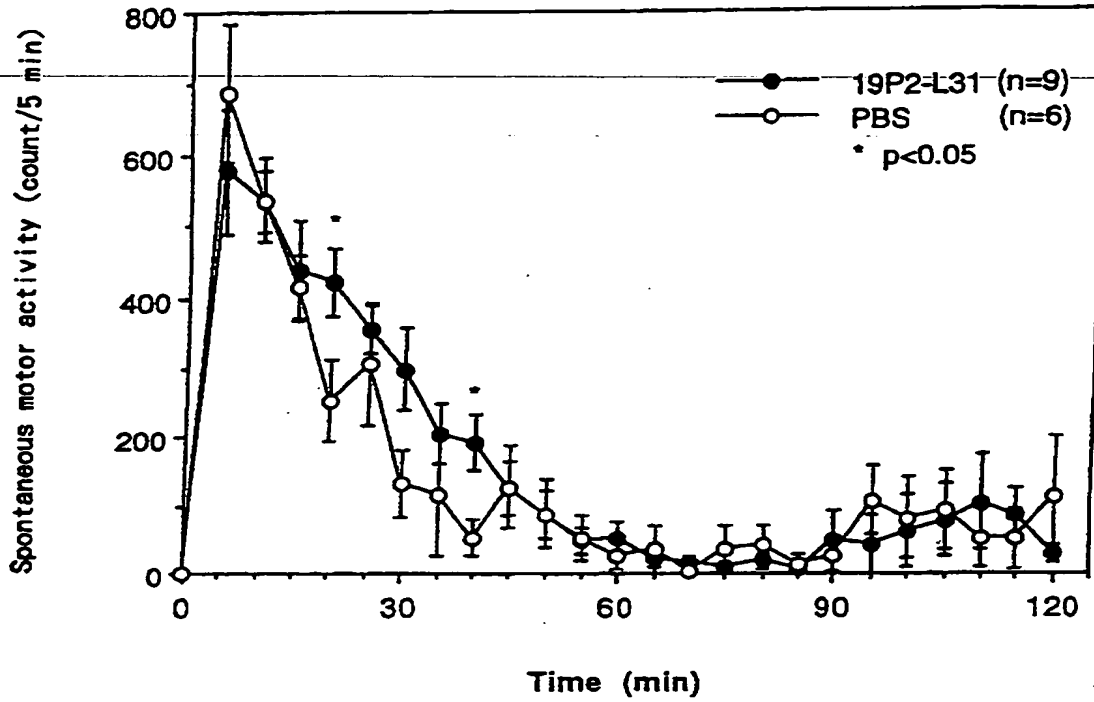
(b)



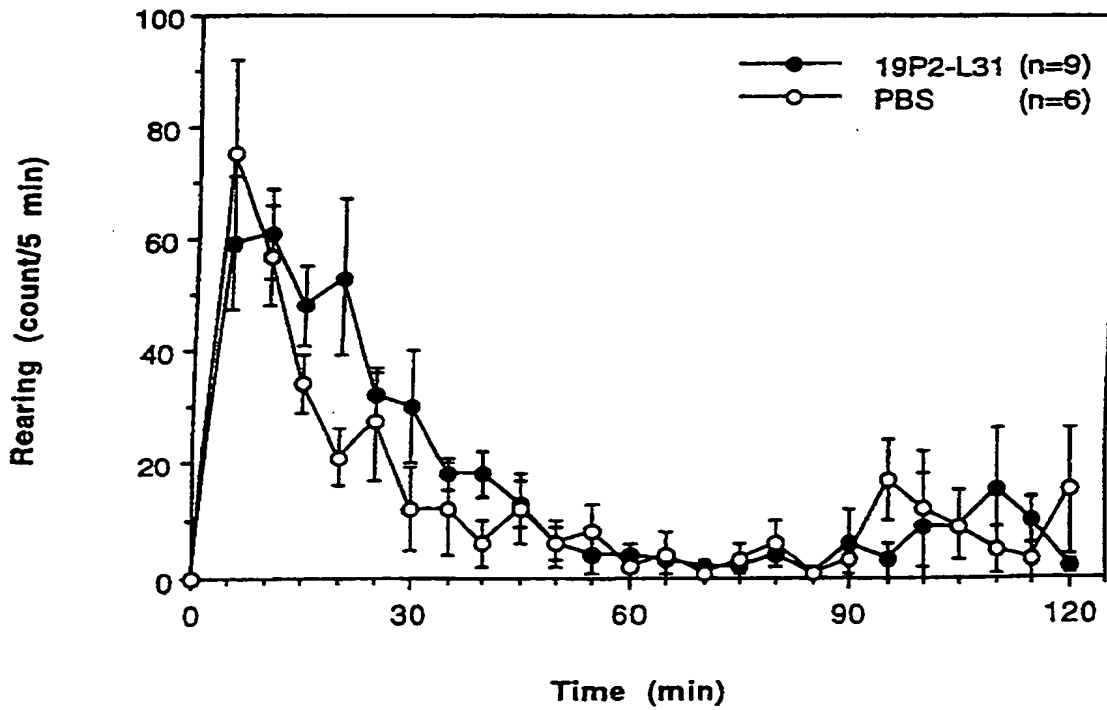


【図44】

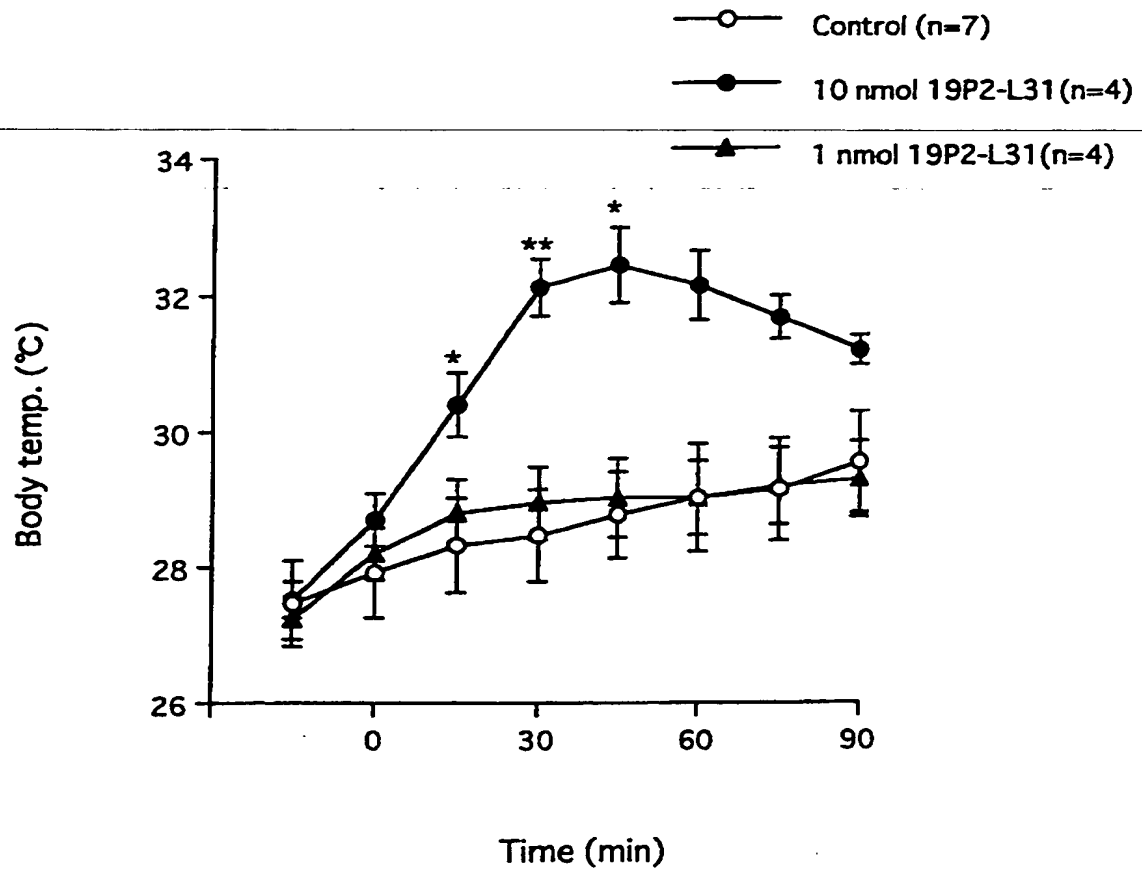
(a)



(b)

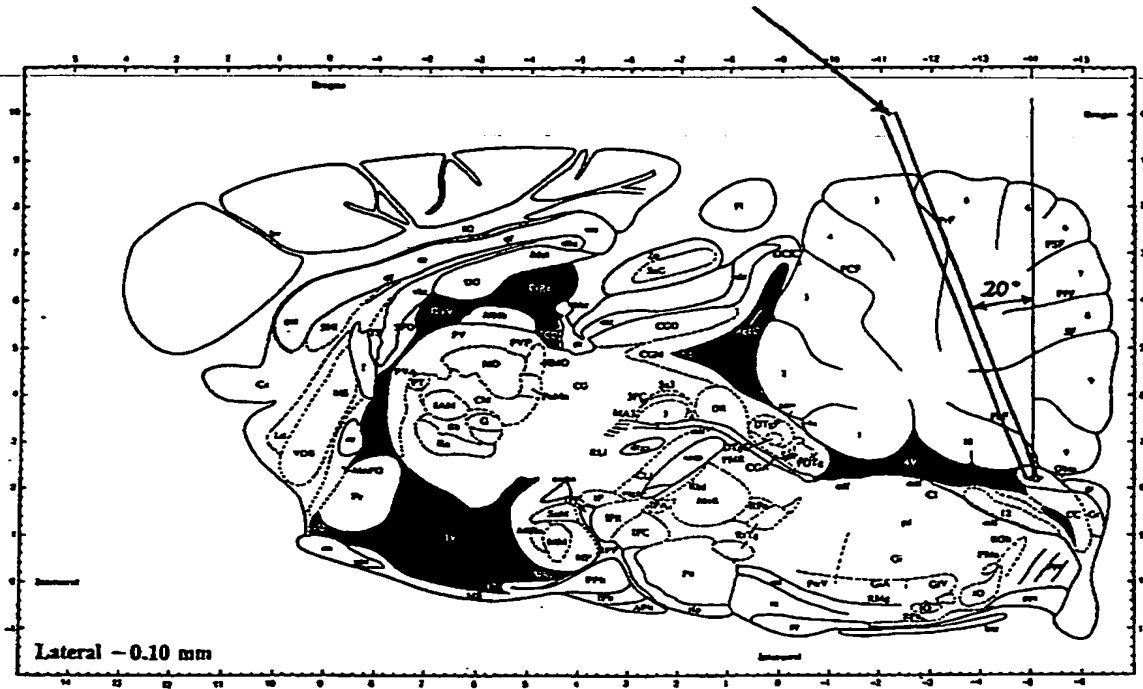


【図 4 5】



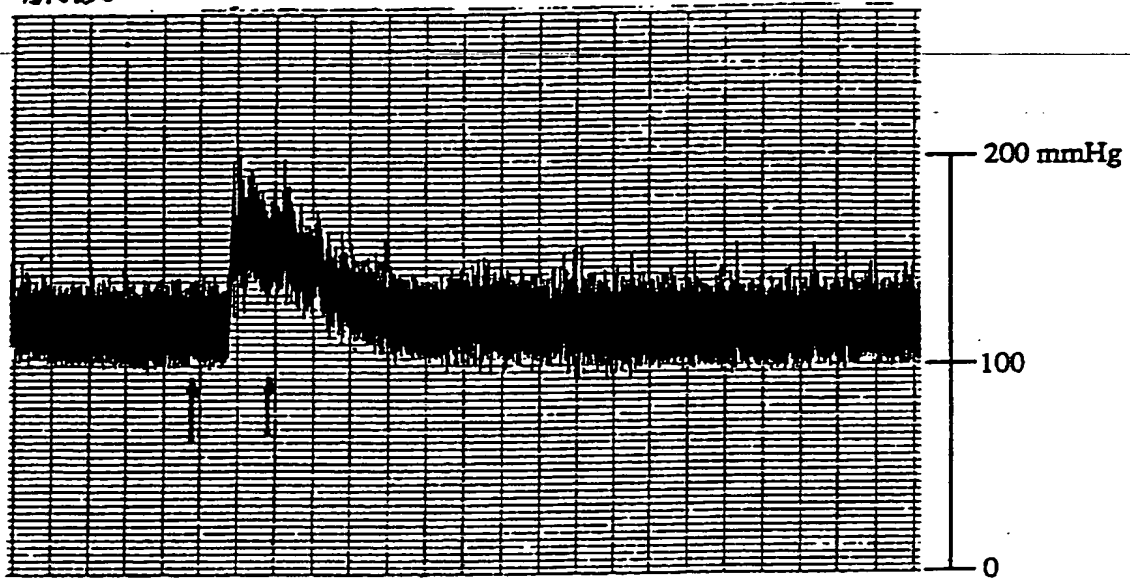
【図46】

マイクロインジェクションカニューレ

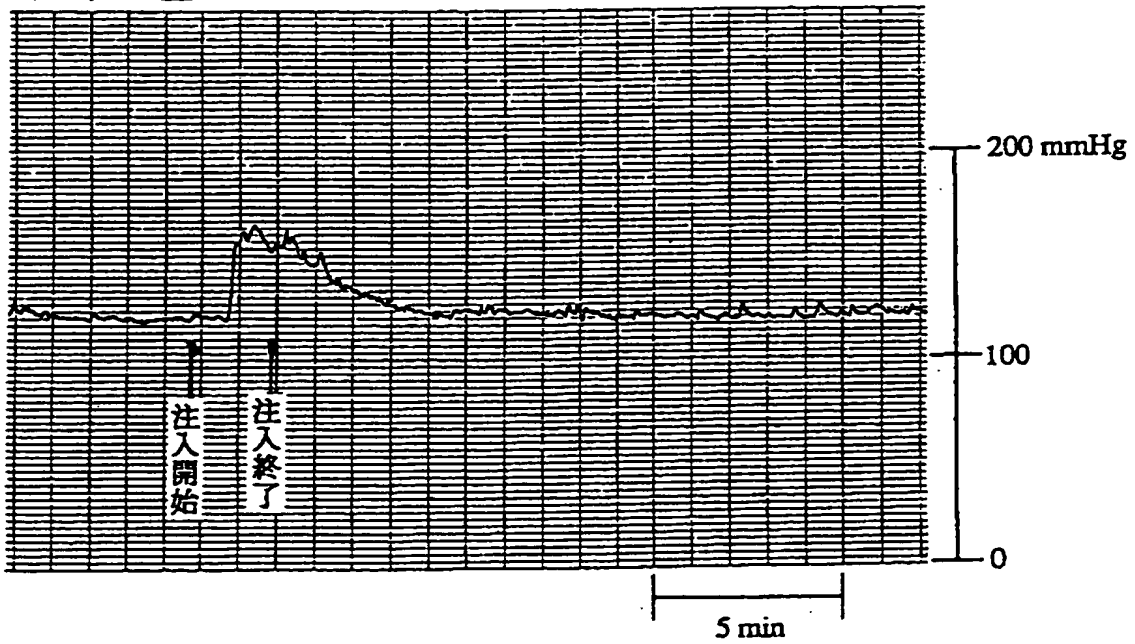


【図47】

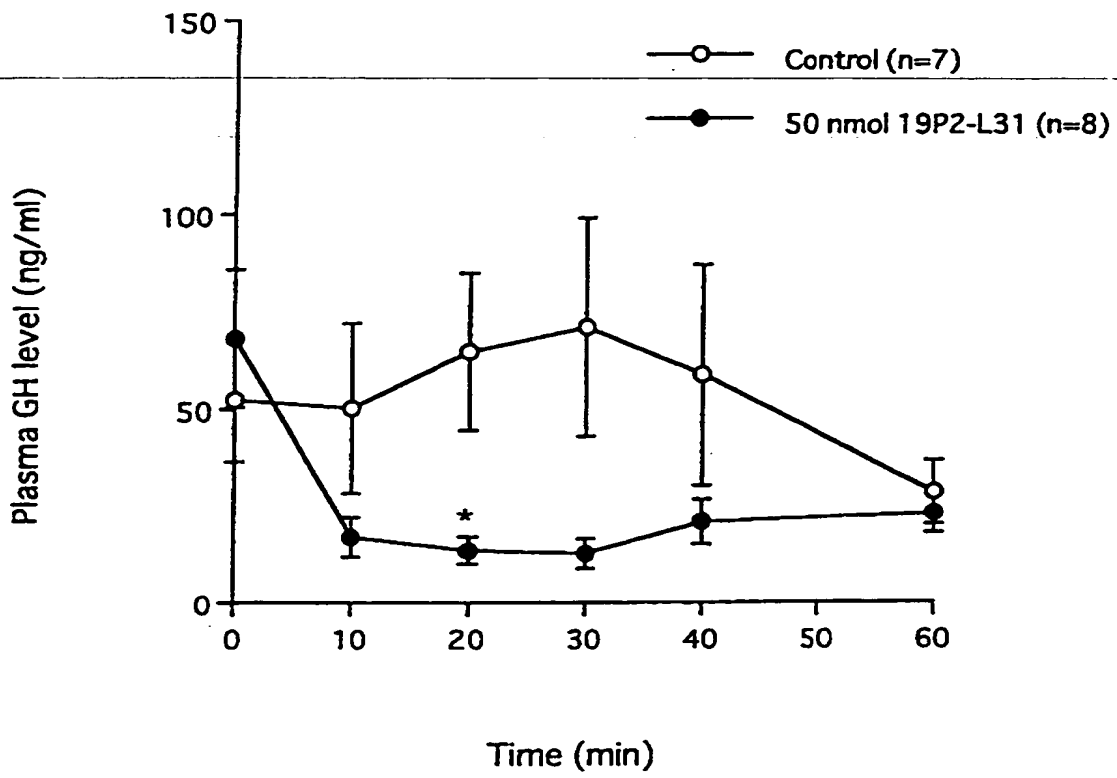
脈波



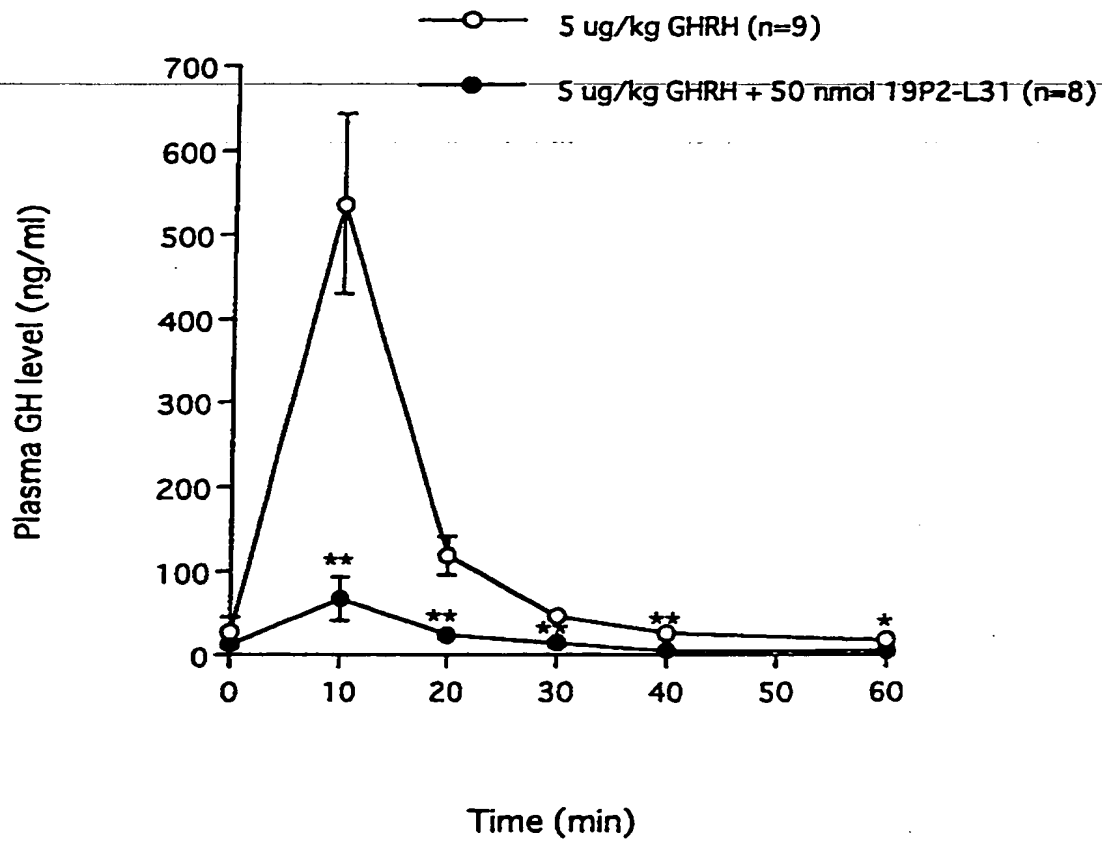
平均血圧



【図48】

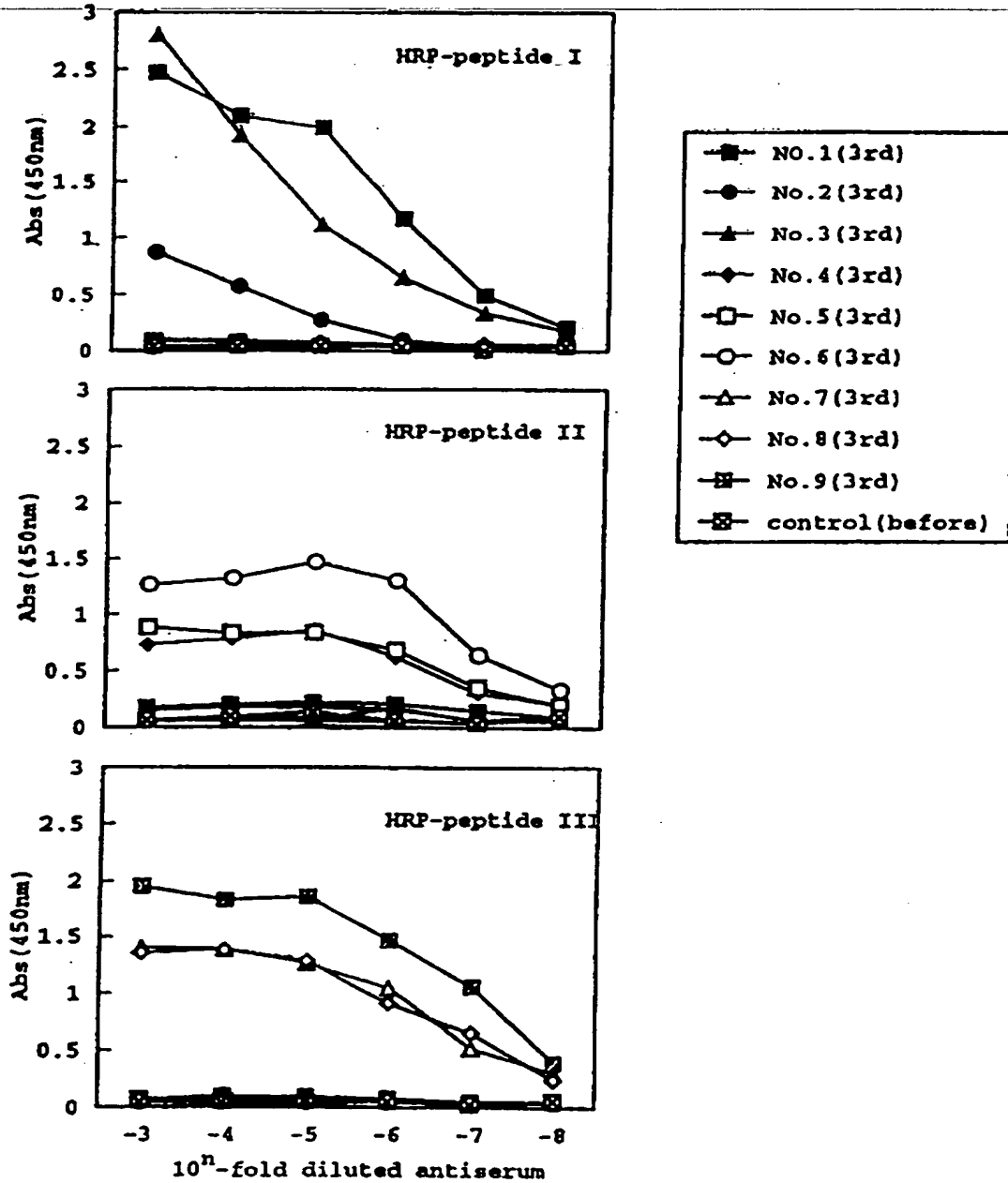


【図49】



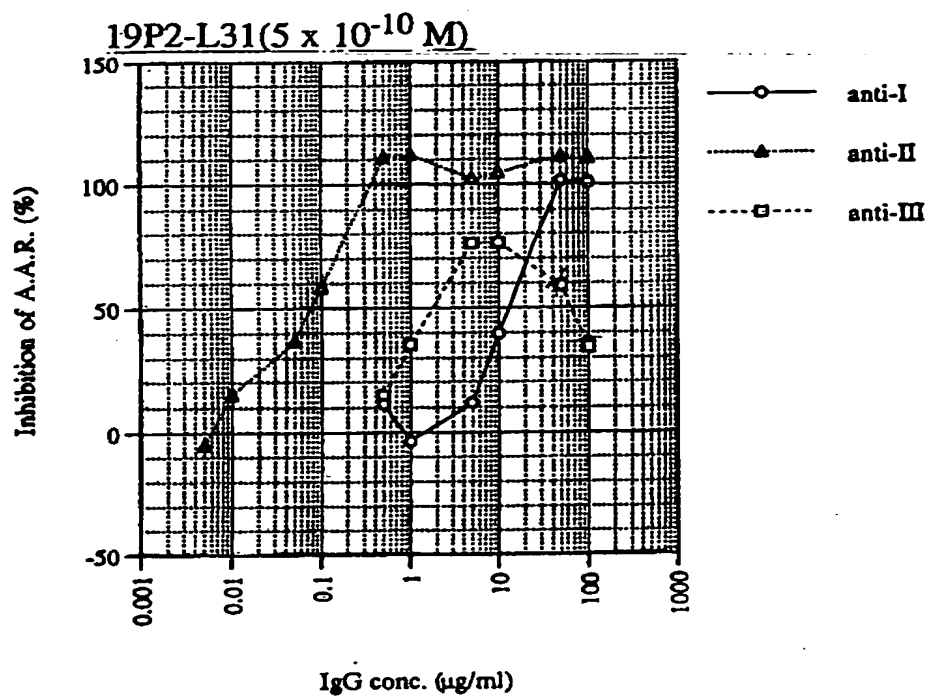
【図50】

Titration curve of anti-bovine 19P2 peptide I, II  
III serum using HRP-peptide I, II or III



【図51】

Inhibition of A.A release by anti 19P2 peptide





【図52】

5'	ATG	ACC	TCA	CTG	CCC	CCG	GGA	ACC	ACT	GGG	GAC	CCC	GAT	TTG	TTT	TCT	GGC	CCG	54	
	Met	Thr	Ser	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Thr	Gly	Asp	Pro	Asp	Leu	Phe	Ser	Gly	Pro		
	TCG	CCA	GGC	GCC	TCC	ACT	CCA	GCC	AAC	CAG	AGT	GCA	GAG	GCT	TCA	GAG	ACC	AAT	108	
	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Thr	Pro	Ala	Asn	Gln	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Glu	Ser	Asn		
	GTG	TCT	GCG	ACG	GTT	CCC	AGA	GCT	GCA	GTC	ACC	CCG	TTC	CAG	AGC	CTG	CAA	162		
	Val	Ser	Ala	Thr	Val	Pro	Arg	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Phe	Gln	Ser	Leu	Gln			
	CTA	GTG	CAC	CAG	CTG	AAG	GGA	CTG	ATC	GTG	ATG	CTC	TAC	AGC	ATC	CTG	GTG	216		
	Leu	Val	His	Gln	Leu	Lys	Gly	Leu	Ile	Val	Met	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Val	Val		
	GTG	GGT	CTG	GTG	GGC	AAC	TGC	CTT	CTT	GTG	CTG	GTG	ATC	CCG	GGC	GTG	CCG	270		
	Val	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Cys	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Arg		
	CTG	CAC	AAC	CTG	ACC	AAC	TTC	CTC	ATC	GCC	AAC	CTC	CCC	TTG	TCC	GAT	GTG	324		
	Leu	His	Asn	Val	Thr	Asn	Phe	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Val	Leu		
	ATG	TGT	GCC	GCC	TGT	GTG	CCG	CTC	ACG	CTG	GCC	TAC	GCC	TTT	GAA	CGT	CGC	378		
	Met	Cys	Ala	Ala	Cys	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Glu	Pro	Arg	Gly		
	TGG	GTG	TTC	GGT	GGA	GGC	CTG	TCC	CAC	CTT	GTT	TTC	TTC	CTG	CAG	CCG	CTC	432		
	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Val	Phe	Phe	Leu	Gln	Pro	Val	Thr		
	GTC	TAC	GTA	TGG	GTG	TTC	ACA	CTC	ACC	ACA	ATC	GCT	GTG	GAC	CCC	TAT	GTC	486		
	Val	Tyr	Val	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Thr	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Val		
	CTG	GTG	CAC	CCG	CTA	CGT	CCG	CCG	ATT	TCA	CTG	AAG	CTC	AGC	GCC	TAC	GCT	540		
	Leu	Val	His	Pro	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Val		
	CTG	GCC	ATC	TGC	GCT	CTA	TCT	GCA	GTC	CTG	GCG	CTG	CCG	GCC	GCG	GTG	CAC	594		
	Leu	Gly	Ile	Trp	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	His	Thr		
	TAC	CAT	GTA	GAG	CTC	AAG	CCC	CAC	GAC	GTG	CCC	CTC	TGC	GAG	GAG	TTC	TGG	648		
	Tyr	His	Val	Glu	Leu	Lys	Pro	His	Asp	Val	Arg	Leu	Cys	Glu	Glu	Phe	Trp	Gly		
	TCG	CAG	GAG	CCG	CAG	GGA	CAG	ATC	TAT	GCC	TGG	GGG	CTG	CTG	GGC	ACC	TAT	702		
	Ser	Gln	Glu	Arg	Gln	Arg	Gln	Ile	Tyr	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Tyr		
	TTG	CTC	CCC	CTG	CTG	GCC	AGT	CTC	CTG	TCT	TAC	GTC	CCG	GTG	TCC	GTG	AAG	756		
	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu		
	CCG	AAC	CCG	GTG	GTG	CGT	GCC	AGC	GTG	ACC	CAG	AGC	CAG	GCT	GAC	TGG	GAC	810		
	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Gln	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg		
	GCG	CGT	GCC	CGT	GCC	ACT	TTC	TGC	CTG	CTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTC	GTG	TTC	864		
	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Phe	Ala		
	GTC	TGC	TGG	CTG	CGT	CTG	CAC	ATT	TTC	AAC	CTG	CTG	CCG	GAC	CTG	GAC	CCG	918		
	Val	Cys	Trp	Leu	Pro	Leu	His	Ile	Phe	Asn	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Asp	Pro	Arg		
	GCC	ATC	GAC	CCC	TAC	GCC	TTC	GGG	CTG	GTG	CAG	CTC	CTC	TCC	CAC	TGC	CTT	972		
	Ala	Ile	Asp	Pro	Tyr	Ala	Phe	Gly	Leu	Val	Gln	Leu	Leu	Cys	His	Trp	Leu	Ala		
	ATG	AGC	TCC	GCC	TGC	TAC	AAC	CCC	TTC	ATC	TAT	GCC	TGC	CTG	CAC	GAC	AGC	TTC	1026	
	Met	Ser	Ser	Ala	Cys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ile	Tyr	Ala	Trp	Leu	His	Asp	Ser	Phe		
	CGA	GAC	GAC	CTA	CCC	AAG	ATG	CTT	CTG	TCT	TGG	CCC	CCG	AAG	ATC	GTG	CGT	1080		
	Arg	Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	Met	Leu	Leu	Ser	Trp	Pro	Arg	Lys	Ile	Val	Pro	His		
	GCC	CAG	AGT	ATG	ACC	GTC	AGT	GTC	GTC	ATC	TGA	TGA	3'							
	Gly	Gln	Asn	Met	Thr	Val	Ser	Val	Val	Ile	***	***								

【図53】

10	20	30	40	50	60
AGATCTGGCA	TCATCCAGGA	AGACGGAGCA	TGGCACCGAG	GACCTGGCTT	CTGTGCTTGC
70	80	90	100	110	120
TGCTGCTAGG	CTTAGTCCTC	CCAGGAGCTT	CCAGCCGAGC	CCACCAGCAC	TCCATGGAGA
130	140	150	160	170	180
CCCGCAGTGA	GTGCCTGGCA	TATGGAGGAC	AGCCACTGTC	ACCTCCCATC	CATATGCTTC
190	200	210	220	230	240
CCAAATGCCT	TGAGTACCCA	GCCCCCTGAAT	GGGAGGTTAG	CCATCTCCTA	AGCCAGTGGT
250	260	270	280	290	300
TTCCAACCTT	CCTAATACAG	AACTTTTAAT	ACAGATCCTT	ATGTTGTGGT	GACCCCCAGC
310	320	330	340	350	360
CAGAAAATTA	TTGTGATGCT	GTTTTTCATAG	TGTAAAGTTT	TGCTACTGTT	ATGGATCATA
370	380	390	400	410	420
ATGTTAATAT	CTGAAATGCA	GGATGTCTGA	TATGCGCCCT	TCCCCC AAA	CAAAAGGGAC
430	440	450	460	470	480
ACAACCCACA	GGTTGAGAGC	CTCTGGGATC	TAAGCAAAAG	CTACCTTACC	ATGCAGTCAG
490	500	510	520	530	540
TTGGGAGATT	GGTCCTGTTA	AGATCTCCCC	AGAATGGTCC	TGTTTCCTGT	CCTCATCAIT
550	560	570	580	590	600
CCCCTAACCC	ATCTTTGTGG	GGTCCCTTAA	GACTTTGGAG	GATGACAGTC	AGACAGGAAG
610	620	630	640	650	660
AGAATACTGA	TCCTGGCATA	TGTCTAAATA	AATTCCTTAA	AGCCACACCA	CTGCCCAGAT
670	680	690	700	710	720
ATGCCCAGCC	AGTGTAATCA	GGGTGGGTGC	CAACATGGCC	TGGTGCCCAG	GTTTCCATCA
730	740	750	760	770	780
GCTTAGGGGC	TCCCGTGTCC	CATACGCTGC	TCTGACTCTT	TCCTTTCCAG	CCCCTGACAT
790	800	810	820	830	840
CAATCCTGCC	TGGTACACGG	GTCGTGGGAT	CAGGCCTGTG	GGCCGCTTCG	GGAGGAGGAG
850	860	870	880	890	900
GGCAGCCCTG	AGGGATGTCA	CCGGACCTGG	CCTGCGGTGC	CGGCTAAGCT	GCTTCCCACT
910	920	930	940	950	960
GGATGGAAGT	GCCAAGTTCT	CTCAGAGCTC	GAGAAGACAG	TGCTGCTGAG	TCGAC. ....

【図54】

AG ATC TGG CAT CAT CCA GGA AGA OGG AGC ATG GCA CCG AGG ACC TGG CTT CTG TGC  
Met Ala Pro Arg Thr Trp Leu Leu Cys

TTG CTG CTG CTA GGC TTA GTC CTC CCA GGA GCT TCC AGC CGA GCC CAC CAG CAC  
Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Leu Pro Gly Ala Ser Ser Arg Ala His Gln His

TCC ATG GAG ACC CGC A GT GAG TGC CTG GCA TAT GGA GGA CAG CCA CTG TCA CCT  
Ser Met Glu Thr Arg

CCC ATC CAT ATG CTT CCC AAA TGC CTT GAG TAC CCA GCC CCT GAA TGG GAG GTT

AGC CAT CTC CTA AGC CAG TGG TTT CCA ACC TTC CTA ATA CAG AAC TTT TAA TAC

AGA TCC TTA TGT TGT GGT GAC CCC CAG CCA GAA AAT TAT TGT GAT GCT GTT TTC

ATA GTT GTA AGT TTT GCT ACT GTT ATG GAT CAT AAT GTT AAT ATC TGA AAT GCA

GGA TGT CTG ATA TGC GCC CTT CCC CCC AAA CAA AAG GGA CAC AAC CCA CAG GTT

GAG AGC CTC TGG GAT CTA AGC AAA AGC TAC CTT ACC ATG CAG TCA GTT GGG AGA

TTG GTC CTG TTA AGA TCT CCC CAG AAT GGT CCT GTT TCC TGT CCT CAT CAT TCC

CCT AAC CCA TCT TTG TGG GGT CCC TTA AGA CTT TGG AGG ATG ACA GTC AGA CAG

GAA GAG AAT ACT GAT CCT GGC ATA TGT CTA AAT AAA TTC CCT AAA GCC ACA CCA

CTG CCC AGA TAT GCC CAG CCA GTG TAA TCA GGG TGG GTG CCA ACA TGG CCT GGT

GCC CAG GTT TCC ATC AGC TTA GGG GCT CCC GTG TCC CAT ACG CTG CTC TGA CTC

TTT CCT TTC CAG CC CCT GAC ATC AAT CCT GCC TGG TAC ACG GGT CGT GGG ATC  
Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile

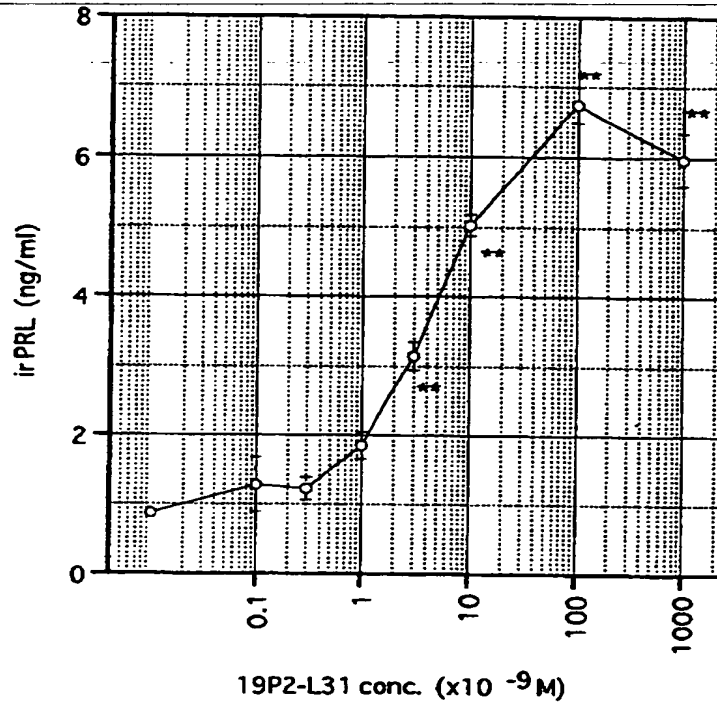
AGG CCT GTG GGC CGC TTC GGG AGG AGG AGG GCA GCC CTG AGG GAT GTC ACC GGA  
Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Ala Leu Arg Asp Val Thr Gly

CCT GGC CTG CCG TGC CCG CTA AGC TGC TTC CCA CTG GAT GGA AGT GCC AAG TTC  
Pro Gly Leu Arg Cys Arg Leu Ser Cys Phe Pro Leu Asp Gly Ser Ala Lys Phe

TCT CAC AGC TGG AGA AGA CAG TGC TGC TGA GTC GAC  
Ser His Ser Ser Arg Arg Gln Cys Cys \*\*\*

【図 5 5】

PRL RIA RC-4B/C P19  
Dose-Response for 30 min



Cell Culture: RC-4B/C P19

$1 \times 10^5$ /well, for 2 Days

(12 well-plates)

(control:  $n=2$ , other points:  $n=4$ )

Wash 3 times

Pre-Incubation (for 15 min)

Wash twice, Add Samples

Incubation (for 30min)

Sup. Collected, Centrifuged

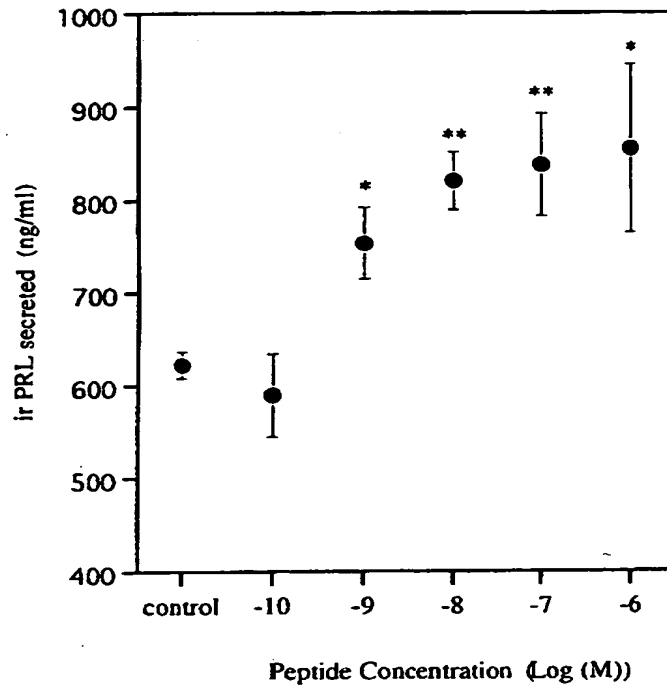
Assay: Rat [ $^{125}$ I] Prolactin

Assay System (RIA) (Amersham)

\*\* $p < 0.01$  (students' t-test)

【図 5 6】

Effect of bovine 19P2-L31 Peptides  
on PRL Secretion from Pituitary Cells



Cell Culture: Rat Anterior Pituitary  
Primary Culture  
(from F344/N Female Lactating)  
 $5.0 \times 10^5$  /well,  
for 4 Days (n=4)  
(Poly-D-Lys. coated 24 well-plates)

Wash 3 times  
Pre-Incubation (for 1 hr)  
Wash twice, Add Samples  
Incubation (for 1 hr)  
Sup. Collected, Centrifuged

Assay: Rat [125I] Prolactin  
Assay System (RIA) (Amersham)

\*\* :  $p < 0.01$  (students' t-test, compared to control)  
\* :  $p < 0.05$  (students' t-test, compared to control)

【書類名】要約書

【要約】

【課題】ペプチドの新規用途の提供。

【解決手段】本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識するポリペプチドの用途に関する。

本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌の促進および抑制作用を有する。従って、本発明におけるリガンドポリペプチドは、(1) プロラクチン分泌促進剤として、卵巣機能低下症、精囊發育不全、骨粗鬆症、更年期障害、乳汁分泌不全、甲状腺機能低下、腎不全などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として、また(2) プロラクチン分泌抑制剤として、高プロラクチン血症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、ストレス、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル (Chiari-Frommel) 症候群、アルゴンツ-デル・カスティロ (Argonz-del Castilo) 症候群、フォーベス・アルブライト (Forbes-Albright) 症候群、乳癌などのプロラクチン分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬として有用である。その他、本発明におけるリガンドポリペプチドは、プロラクチン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、牛、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

【選択図】なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100073955

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 武田

薬品工業株式会社内

【氏名又は名称】 岩谷 龍

特平 9-165437

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
氏 名 武田薬品工業株式会社